



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA



**Importancia de la GTPasa Gpn3 en la formación de
lamelipodios en las células humanas de mama MCF-12A**

TESIS QUE PRESENTA

LIC. EN BIOLOGÍA JOSÉ CARLOS BORIS RODRÍGUEZ KHAZINA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Roberto Sánchez Olea
Dra. Mónica Raquel Calera Medina

Agosto del 2026

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Celular y Biología Molecular en el Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la co-tutoría del Dr. Roberto Sánchez Olea y la Dra. Mónica R. Calera Medina gracias al apoyo Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación que otorgó la beca con número 2022-000018-02NACF-13249 (CVU: 1244940). Se agradece el apoyo de la Secihti a través del proyecto no. A1-S-21070 al Dr. Roberto Sánchez Olea

Tesis que presenta:

LIC. EN BIOLOGÍA JOSÉ CARLOS BORIS RODRÍGUEZ KHAZINA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Roberto Sánchez Olea

Dra. Mónica Raquel Calera Medina

ASESORES INTERNOS

Dra. Esther Layseca Espinosa

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

JURADO

Presidente: Dra. Perla del Carmen Niño Moreno

Secretaria: Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Sinodal: Dra. Esther Layseca Espinosa

Sinodal: Dr. Othoniel Hugo Aragón Martínez

Agosto 2026



Importancia de la GTPasa Gpn3 en la formación de lamelipodios en las células humanas de mama MCF-12A © 2026 por José Carlos Boris Rodríguez Khazina se distribuye bajo Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Importancia de la GTPasa Gpn3 en la formación de lamelipodios en las células humanas de mama MCF-12A

Boris Khazina^{1,2}, Roberto Sánchez-Olea³, Mónica Raquel Calera Medina³.

¹ Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Sierra Leona 550, Lomas de San Luis, 78210 San Luis Potosí, S.L.P., México.

² Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Venustiano Carranza 2405, Lomas los Filtros, código postal 78210 San Luis Potosí, S.L.P., México.

³ Departamento de Biofísica, Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Parque Chapultepec 1570, Privadas del Pedregal, 78295 San Luis Potosí, S.L.P., México.

*Autor de correspondencia: Dr. Roberto Sánchez-Olea y Dra. Mónica Calera Medina

Email:

Resumen

Las GTPasas son enzimas que regulan diversas funciones celulares actuando como interruptores moleculares. Dentro de la familia de las GTPasas, las GPN (Glycine-Proline-Asparagine) son esenciales en eucariotas, participando en la regulación y acumulación nuclear de la RNA polimerasa II (RNAPII). En este estudio, se investigó el papel del dominio WH2 de la GTPasa Gpn3 en la interacción con actina globular y su influencia en la formación de lamelipodios y migración celular en líneas MCF-12A.

Se realizó un modelado *in-silico* utilizando HADDOCK 2.4, revelando una posible interacción entre el dominio WH2 de Gpn3 y la actina globular. Adicionalmente, se construyó la mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A, confirmando su expresión y estabilidad en líneas celulares. Los ensayos experimentales indicaron que esta mutación afecta la formación de lamelipodios, mostrando una tendencia a reducir su formación bajo condiciones de ayuno y aumentar bajo estímulo con medio completo, en comparación con la variante salvaje. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la migración celular entre las líneas estudiadas, sugiriendo que la mutación en el dominio WH2 de Gpn3 no compromete su función en la migración celular, aunque sí parece influir en la regulación de la actina bajo ciertos estímulos. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el papel del dominio WH2 de Gpn3 en la dinámica del citoesqueleto de actina.

Introducción

Las proteínas unidas a GTP o GTPasas, son enzimas que regulan diversas funciones celulares a través de su actividad catalítica. Estas se encuentran activas cuando están unidas a GTP y cuando esta molécula es hidrolizada se produce un cambio conformacional, lo cual conlleva a un estado inactivo (Alberts, 2015, p. 820). Debido a lo anterior, las GTPasas funcionan como interruptores moleculares, esto atribuido a dos familias de proteínas que participan en los cambios de actividad de las GTPasas; los GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors), los cuales inducen la liberación del GDP y el intercambio a GTP y los GAPs (GTPase-activating proteins), que incrementan el índice de hidrólisis del GTP unido a las GTPasas (Alberts, 2015, p. 820).

Existen diversas familias de GTPasas, una de ellas es la familia de las GTPasas GPNs (nombre dado por su motivo conservado; Glycine–Proline–Asparagine), la cual se compone de tres proteínas presentes; Gpn1, Gpn2 y Gpn3. Las GTPasas GPN se encuentran muy conservadas en el proceso de evolución. Están presentes en todos los organismos eucariotas, y en arquea se ha descrito solamente una copia de estas GTPasas (Alonso et al., 2013) la cual es más similar a Gpn1. Además, se ha demostrado que cada miembro de la familia Gpn es esencial en todos los organismos en los que se ha evaluado, por ejemplo, la delección de cualquiera de los genes codificantes para las proteínas Gpn en *Saccharomyces cerevisiae* resulta en un efecto letal (Giaever et al., 2002). Una de las funciones más relevantes de las proteínas Gpn se relaciona con la RNA polimerasa II (RNAPII). Se conoce que Gpn3 y Gpn1 interactúan físicamente con la RNAPII, además participan en su regulación y acumulación nuclear (Forget, et al., 2010; Carré y Shiekhattar, 2011; Calera et al., 2011).

En nuestro grupo de trabajo, se ha encontrado que Gpn3 (33kDa) tiene una localización citoplásmica en células de mama no cancerosas MCF12-A sembradas de manera subconfluente. Este efecto en la localización citoplásmica aumenta cuando las células son tratadas con medio de ayuno. Sorprendentemente, cuando las células MCF12A son incubadas durante 4 horas con medio de ayuno y posteriormente se cambia a medio completo, Gpn3 se trasloca al núcleo y a unas estructuras membranales hasta ahora no identificadas (Peña-

Gómez, Sonia Griselda. Datos no publicados). Al hacer experimentos complementarios, se encontró que las estructuras membranales en donde se encuentra Gpn3 co-localizan con los filamentos de actina. Existen diferentes estructuras formadas por filamentos de actina, como los lamelipodios, filopodios, ruffles, etc. Debido a la morfología, localización y al marcador molecular cortactina, se confirmó que estas estructuras de Actina filamentosa donde co-localiza Gpn3 son lamelipodios.

Los lamelipodios son estructuras aplanadas que se extienden de la membrana, conformados por una malla de filamentos de actina entrelazados. Para su formación, se requiere de un conjunto de proteínas, siendo las más esenciales la Actina globular, el complejo Arp2/3 y un factor activador de la nucleación (generalmente una proteína de la familia WAVE) (Alberts, 2015, p. 820).

Las GTPasas de la familia de las GPN cuentan con 2 inserciones únicas: la inserción 1 y 2. A través de la base de datos ELM (Eukaryotic Linear Motif) (ELM, 2022), se encontró que Gpn3 contiene un dominio WASP-homology 2 (WH2) en la inserción 1, el cual se encuentra altamente conservado en las Gpn3 de diferentes especies. Este dominio está presente en la mayoría de los factores de nucleación y elongación de filamentos de actina identificados, como lo son las proteínas de la familia WAVE (Dominguez, 2016), así como otras proteínas que interactúan con la actina globular como las timosinas (Paunola, Mattila, y Lappalainen, 2002).

Por lo anterior, se conoce que las proteínas que contienen el domino WH2 tienen una actividad regulatoria en los procesos de nucleación de actina, como lo es el caso de los factores nucleadores de actina (al participar en la activación del complejo Arp2/3), los cuales permiten que se lleve a cabo la polimerización de la Actina globular, sin embargo, otras proteínas como las timosinas (anteriormente mencionadas), se han relacionado más a una regulación negativa, secuestrando la actina globular (formando un complejo 1:1) y así inhibiendo la formación de Actina filamentosa.

Materiales y métodos

Reactivos.

Los reactivos para llevar a cabo los cultivos de las líneas celulares se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA), los demás reactivos fueron obtenidos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Anticuerpos y agentes de tinción.

El anticuerpo anti-Gpn3 fue generado en conejo contra una proteína recombinante HisGpn3 producida en bacterias BL21 (DE3), mientras que la faloidina y el DAPI se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Modelado de Gpn3 y Gpn3 L69A/R70A con la actina.

Métodos bioinformáticos

Gpn3 se modeló por medio del programa de inteligencia artificial ESM Metagenomic Atlas (ESM Atlas, 2023). El modelo de actina (PDB ID: 2A41) se obtuvo mediante RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB, 2024).

Minimización de energía

La minimización de energía de las estructuras proteicas fue realizada utilizando el programa Chimera. La minimización se llevó a cabo utilizando el algoritmo de minimización de gradiente conjugado, aplicando el campo de fuerzas Amber ff14SB. Los parámetros por defecto del programa se utilizaron para establecer las condiciones de corte para interacciones no covalentes y para definir los ciclos de minimización. Este proceso permitió obtener estructuras energéticamente optimizadas para su uso en posteriores simulaciones de acoplamiento.

Acoplamiento proteína-proteína con Haddock

El acoplamiento proteína-proteína (docking) fue realizado utilizando el servidor web HADDOCK 2.4. Para ello, se emplearon las estructuras minimizadas de las proteínas Gpn3 y actina. Los PDBs de las proteínas se cargaron en HADDOCK, y se definieron los residuos de interés para Gpn3 (dominio WH2: 56-ELIEVDDVMEDDSLRF-72) y para la actina

(los subdominios 1 y 3), basados en datos bibliográficos (ELM, 2022). El acoplamiento se realizó bajo el modo semiautomático, permitiendo que HADDOCK generara múltiples posibles complejos mediante la combinación de orientaciones y conformaciones de las proteínas. El resultado fue un conjunto de soluciones agrupadas en diferentes clústeres, ordenados según su puntaje denominado “puntaje HADDOCK”, que integra diversos parámetros energéticos para identificar las conformaciones más probables. Los clústeres de mayor relevancia fueron seleccionados para un análisis posterior.

Subclonación de Gpn3RFlag-pLNCX2 y creación de la construcción molecular Gpn3RFlag-L69A/R70A.

El cDNA de la construcción Gpn3RFlag-pEYFP fue sub-clonado en el vector pLNCX2 a través de los sitios de restricción Hind III y Not I. Para la generación de la construcción molecular mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A se realizó mutagénesis sitio dirigido en el termociclador C-100 Thermal Cycler usando como template a Gpn3RFlag-pEYFP. A continuación, se presenta los oligonucleótidos utilizados para la construcción molecular Gpn3RFlag-L69A/R70A; Fwd 5' gatgtaatggaggatgattctgcggcattcggtcccaacggaggatt 3' y 5' aatcctccgttgggaccgaatgccgcagaatcatcctccattacatc 3'. Los primers fueron diseñados utilizando las herramientas disponibles en el sitio web de New England Biolabs (New England Biolabs, 2023). Una vez obtenido el producto, se incubó durante 1 hora con la enzima de restricción DpnI. Se verificó la correcta generación de la mutación en la construcción molecular mediante secuenciación, realizada en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT).

Condiciones del cultivo celular.

Las líneas celulares HEK293T y MCF-12A fueron adquiridas de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 25 mM de glucosa y suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Por otro lado, las células MCF-12A se mantuvieron en medio DMEM-F12, complementado con un 5% de suero de caballo (HS), 20 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico), 100 ng/ml de toxina del cólera, 10 µg/ml de insulina y 0.5 µg/ml de hidrocortisona. Ambos medios de cultivo incluían 100 U/ml de penicilina y 100 µl/ml de estreptomycin. Los cultivos de ambas líneas celulares se llevaron a cabo en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 37 °C.

Generación de líneas celulares MCF-12A Gpn3RFlag g193, MCF-12A Gpn3RFlag g239, MCF-12A Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 y MCF-12A Gpn3RFlag-L69A/R70A g239 a través de la formación de partículas retrovirales en la línea celular HEK293T.

Para la creación de los cultivos celulares MCF-12A Gpn3RFlag g193, MCF-12A Gpn3RFlag g239, Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 y Gpn3RFlag-L69A/R70A g239 se utilizaron dos procesos: la transfección y la infección. Para la sobreexpresión de las construcciones moleculares se sembraron 3×10^6 células HEK293T en cajas petri y se transfectaron 24 horas después por el método de fosfato de calcio, el cual consistió en preparar 2 tubos de ensayo. Al primer tubo se le adicionó 500 μ l de solución salina HEPES 2X (HBS; 274 mM de cloruro de sodio, 10 mM de cloruro de potasio, 1.4 mM de fosfato de sodio dibásico, 15 mM de glucosa y 42 mM de HEPES pH 7.05), mientras que al segundo tubo de ensayo se le agregó 62.5 μ l de la solución de cloruro de calcio (CaCl_2), 5 μ l de gag-pol (1 μ g/ μ l), 5 μ l VSV-G (1 μ g/ μ l), 417.5 μ l de Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, .5 μ l de Yellow Fluorescent Protein (YFP, 1 μ g/ μ l) y 10 μ l (1 μ g/ μ l) de los DNA de las construcciones moleculares Gpn3RFlag o Gpn3RFlag-L69A/R70A. Una vez preparadas las soluciones, se puso el primer tubo (HEPES 2X) en el vórtex y lentamente se le adicionó por medio de una micropipeta de 200 el contenido del segundo tubo. Al terminar este proceso, se dejó 20 minutos sin movimientos y pasado el tiempo se retiró el medio de las células HEK293T y se le agregó medio fresco más la solución final los cuales, se dejaron por 6 h y después se cambió el medio por nuevo. Se dejan las células por 48 h para posteriormente recolectar el medio, pasarlas a un tubo cónico de 15 ml y centrifugarse a 1500 revoluciones por minuto (RPM) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se utilizó una jeringa (donde se adiciona el medio centrifugado), un filtro de jeringa de .45 μ m y un nuevo tubo cónico de 15 ml donde se recolectaron las partículas retrovirales que sobreexpresan las construcciones moleculares. 24 h antes de la obtención de las partículas retrovirales se sembraron 1.4×10^6 células MCF-12A, las cuales fueron infectadas preparando en nuevos tubos la siguiente solución; 3 ml de medio DMEM-F12 para las construcciones y 6 ml para el control, 2.4 μ l de polibrina y 1.5 μ l de las partículas retrovirales de cada construcción. 24 h después se realizó la selección, para ello se adicionó 10 μ l de geneticina por cada 1 ml de medio. 72 h después se repitió el proceso y a las 120 h se tripsinizaron las células sobrevivientes. El mismo procedimiento se llevó a cabo para generar las partículas retrovirales de los shRNA g193 y g239, utilizando el propio DNA en la transfección y en la infección utilizando 4 μ l de puomicina por cada 10 ml de medio en vez de la geneticina y dejándolo solo 48 h en el proceso de selección.

Procedimientos experimentales.

Ensayo de formación de lamelipodios

Se sembraron 1.8×10^5 células MCF-12A y de las líneas celulares previamente mencionadas en multiplacas de 12 pozos y 24 h después se dejaron en medio de ayuno DMEM-F12 (sin complementos) durante 4 h. Posteriormente se estimularon con medio de ayuno o medio completo durante 30 y 60 minutos. Finalizado el tiempo, se les retiró el medio

y se lavaron las células con solución salina de fosfatos (PBS, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl y 2 mM de KH_2PO_4) Y se fijaron las células con paraformaldehído al 37 % en PBS durante 15 minutos. El exceso de paraformaldehído se eliminó con dos lavados en PBS. Luego, las células se permeabilizaron y bloquearon con una solución de PBS que contenía 10% de FBS y 0.2% de Tritón X-100 durante 15 minutos. Después, se retiró el exceso de la solución bloqueadora/permeabilizadora con un lavado con PBS. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-Gpn3 de conejo diluido 1:1000 e incubado a 4 °C durante toda la noche. Tras la incubación, se eliminaron los restos del anticuerpo primario mediante 3 lavados con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con Alexa Fluor 488, diluido 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados en PBS y se adicionó faloidina a 0.5 μM , dejándola incubar durante 15 minutos. Finalmente, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI diluido 1:5000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. La formación de lamelipodios, así como la distribución subcelular de las construcciones de Gpn3RFlag se analizó en un microscopio de fluorescencia invertido.

Ensayo de cierre de herida.

Se sembraron 3.5×10^5 células MCF-12A y de las líneas celulares previamente mencionadas en multiplacas de 12 pozos y 24 h después se dejaron en medio de ayuno DMEM-F12 durante 6 h. Posteriormente se les realizó la herida conforme fueron estimuladas con medio de ayuno o medio completo durante 30 y 60 minutos. El lavado y fijación son los mismos anteriormente descritos. Para la determinación del cierre de herida se tomaron 3 fotografías a través de un microscopio de fluorescencia invertido.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1. Las diferencias entre grupos experimentales se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post -hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (EE), y los gráficos fueron generados en GraphPad Prism.

Resultados

Interacción del posible dominio WH2 de la GTPasa Gpn3 con actina globular in-sílico.

Con el fin de evaluar la posible interacción entre el dominio WH2 de Gpn3 y G-actina, se realizó una simulación de acoplamiento molecular proteína-proteína utilizando HADDOCK 2.4 (Van Zundert et al., 2016). Se realizó un modelo (**Figura 1**) del acoplamiento de Gpn3 y G-actina y se obtuvieron los parámetros particulares de esta interacción (**Tabla 1**).

Construcción molecular de Gpn3RFlag-L69A/R70A en el vector retroviral pLNCX2.

Se llevó a cabo la construcción de la mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A mediante técnicas de clonación molecular estándar. Utilizando mutagénesis dirigida, se introdujeron alaninas en la posición 69 y 70, sustituyendo así a la leucina y arginina (respectivamente) en la secuencia de Gpn3. Este DNA ya contenía una etiqueta Flag en el extremo C-terminal y una resistencia contra el shRNA g193. La construcción fue verificada mediante secuenciación de ADN, confirmando la presencia de las mutaciones específicas (**Figura 2 a**). Una vez confirmadas las mutaciones, se digirió y subclonó en el vector retroviral pLNCX2 (**Figura 2 b**).

Líneas celulares MCF-12A Gpn3RFlag g193, MCF-12A Gpn3RFlag g239, MCF-12A Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 y MCF-12A Gpn3RFlag-L69A/R70A g239 a través de la formación de partículas retrovirales.

Se lograron generar con éxito las líneas celulares MCF-12A expresando tanto la variante salvaje Gpn3RFlag que disminuye la expresión endógena (g193) y el control (g239) como la versión mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A que disminuye la expresión endógena (g193) y el control de esta misma (g239). La eficiencia de las partículas retrovirales (**Figura 3 a, b, c y d**) generadas en las células HEK293T y la infección de las células MCF-12A permitieron establecer estas cuatro líneas celulares de manera estable. La confirmación de la expresión de Gpn3RFlag y su mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A con sus shRNAs correspondientes se realizó mediante análisis de Western blot (**Figura 3 e**), donde se observa a Gpn3RFlag g193, Gpn3RFlag g239, Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 y Gpn3RFlag-L69A/R70A g239. Estos resultados indican no solo la correcta expresión de los constructos en las líneas celulares establecidas, sino también la estabilidad de la expresión a largo plazo, lo que asegura la idoneidad de estas líneas para futuros experimentos funcionales.

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la formación de lamelipodios.

La formación de lamelipodios fue evaluada en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A bajo las siguientes condiciones de estímulo: las células fueron sometidas a un ayuno de 4 horas y luego estimuladas con medio de ayuno por 30 min (**Figura 4 a**), medio completo por 30 min (**Figura 4 b**), medio de ayuno 60 min (**Figura 4 c**) y medio completo por 60 min (**Figura 4 d**). En las condiciones estimuladas con medio completo de 30 y 60 min se pueden observar los lamelipodios y la actina filamentosa marcadas con una flecha. Los datos cuantitativos se presentan como un gráfico (**Figura 4 e**), donde se observa el número de células con lamelipodios en cada condición. El número de lamelipodios fue significativamente menor en las condiciones de células estimuladas con medio de ayuno en comparación con aquellas estimuladas con medio completo. No hubo diferencias significativas entre las líneas celulares, sin embargo, se observó una tendencia en la línea mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A, ya que en los estímulos con ayuno mostraron una tendencia menor a formación de lamelipodios, mientras que el estímulo con medio completo de 60 min de esta misma línea tuvo el mayor conteo de lamelipodios sobre las demás líneas.

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la migración.

La migración celular fue evaluada en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A bajo las siguientes condiciones de estímulo: las células fueron sometidas a un ayuno de 6 horas y luego estimuladas con medio de ayuno por 4 h, medio completo por 4 h, medio de ayuno 8 h y medio completo por 8 h (**Figura 5 a**). En estas figuras se aprecia en amarillo el área delimitada tomada como valor. Los datos cuantitativos se presentan como un gráfico (**Figura 5 b**), donde se observa el área total medida en cada condición. El área de cierre de herida fue significativamente menor en las condiciones de células estimuladas con medio de ayuno en comparación con aquellas estimuladas con medio completo. No hubo diferencias significativas entre las líneas celulares.

La localización subcelular de Gpn3RFlag y la morfología de las células MCF-12A cambia con la mutación L69A/R70A.

La localización subcelular de Gpn3 se evaluó mediante el ensayo de formación de lamelipodios previamente descrito. Se analizó la co-localización de Gpn3 con lamelipodios en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag g193, Gpn3RFlag g239, Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 y Gpn3RFlag-L69A/R70A g239, bajo condiciones de medio de ayuno y medio completo a 30 y 60 minutos. Gpn3 co-localizó con los lamelipodios en todas las líneas celulares cuando se utilizó medio completo. Sin embargo, bajo condiciones de ayuno, donde no se observaron lamelipodios, Gpn3RFlag-L69A/R70A g193 mostró una localización tanto citoplasmática como nuclear, acompañada de cambios en la morfología celular en comparación con las demás líneas.

Discusión

Interacción del posible dominio WH2 de la GTPasa Gpn3 con actina globular in-sílico.

La simulación de acoplamiento entre Gpn3 y actina globular proporciona evidencia preliminar de que el dominio WH2 de Gpn3 podría desempeñar un papel en la interacción con la actina, lo cual es coherente con las funciones conocidas de otros dominios WH2 (Paunola et al., 2002; Zuchero et al., 2009, 2012; Dominguez, 2016; Xue & Robinson, 2016) que regulan la unión a actina. A pesar de que el HADDOCK score sugiere una conformación relativamente estable, la alta energía del parámetro de violación de restricciones indica que algunas de las restricciones impuestas durante el acoplamiento podrían no haberse cumplido o haber sido difíciles de cumplir, sugiriendo que el modelo podría estar forzando interacciones que no serían tan favorables en condiciones biológicas. Sin embargo, la significativa superficie enterrada y las energías de Van der Waals y electrostática negativas apoyan la idea de una posible interacción entre estas dos proteínas.

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la formación de lamelipodios.

En el presente estudio, se observó que la línea celular Gpn3RFlag-L69A/R70A, que contiene mutaciones en el dominio WH2, mostró una tendencia a formar menos lamelipodios en comparación con las líneas MCF-12A y Gpn3RFlag bajo condiciones de ayuno tanto a 30 minutos como a 60 minutos. Esta disminución en la formación de lamelipodios podría deberse a que, bajo estas condiciones, Gpn3 funcione de manera similar a otras proteínas que contienen el dominio WH2, como JMY y WAVE, que actúan como activadores de la nucleación de actina a través del complejo Arp 2/3 (Zuchero et al., 2009; Campellone, 2023).

Por otro lado, cuando las células fueron estimuladas con medio completo durante 60 minutos, se observó un aumento en la formación de lamelipodios en la línea Gpn3RFlag-L69A/R70A, superando incluso a las líneas MCF-12A y Gpn3RFlag. El dominio WH2 es conocido por su capacidad de secuestrar actina globular, formando complejos 1:1 que inhiben su participación en la polimerización de actina, lo que afecta diversos procesos celulares (Renault, 2016), es por ello que, este resultado podría indicar que debido a la mutación y bajo condiciones óptimas de nutrientes Gpn3RFlag-L69A/R70A a través de su dominio WH2 puede regular de manera negativa la polimerización de actina a través de su unión directa, sin embargo, al encontrarse mutado este dominio ya no es posible el secuestro y por ende la polimerización de filamentos de actina es mayor.

A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares en la formación de lamelipodios, se identifica una clara tendencia en la línea mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A. Esta tendencia sugiere que la mutación en el dominio WH2 afecta la regulación de la actina, dependiendo de las condiciones ambientales, como lo

indican los resultados obtenidos con medios de ayuno y completo. Estas observaciones respaldan la idea de que Gpn3 podría participar tanto en la regulación positiva como negativa de la nucleación de actina, similar a lo que ocurre con otras proteínas con el dominio WH2, dependiendo del contexto celular y de los estímulos presentes (Paunola et al., 2002; Zuchero et al., 2009, 2012; Dominguez, 2016; Renault, 2016; Xue & Robinson, 2016).

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la migración.

Los resultados del ensayo de cierre de herida sugieren que la capacidad migratoria de las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag, y Gpn3RFlag-L69A/R70A es relativamente similar bajo las condiciones estudiadas, tanto en medios de ayuno como en medios completos. La disminución del área observada después de 8 horas en ambas condiciones sugiere que todas las líneas celulares pueden migrar y cerrar la herida eficientemente, independientemente de la mutación en el dominio WH2 de Gpn3.

El dominio WH2 está ampliamente reconocido en la literatura científica por su papel en la regulación tanto positiva como negativa de la actina, siendo fundamental en la formación de estructuras migratorias como los lamelipodios (Shekar, Pernier y Carlier, 2016). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de este estudio y considerando la mutación específica en Gpn3, no se observaron efectos significativos en la migración celular, lo que sugiere que esta mutación no compromete la función migratoria de las células.

La localización subcelular de Gpn3RFlag y la morfología de las células MCF-12A cambia con la mutación L69A/R70A.

Ahuja y colaboradores (2007) realizaron un estudio con la proteína Cobl (Cordon-bleu), la cual contiene tres dominios WH2. En dicho estudio, generaron diversas mutantes en las que se eliminaban dominios específicos de esta proteína. Descubrieron que al eliminar dos de los tres dominios WH2, Cobl perdía su capacidad para polimerizar actina, lo que resultaba en alteraciones significativas en la morfología celular. Por otro lado, Gpn3 es esencial para el ensamblaje de la RNA polimerasa II, formando un heterodímero con Gpn1 (Calera et al., 2011), el cual también posee un dominio WH2 (ELM, 2022). Con base en lo anterior, es plausible que Gpn3 y Gpn1 trabajen en conjunto a través de sus dominios WH2 en actividad con la actina, pero la mutación del dominio WH2 de Gpn3, pueda influir negativamente en su capacidad para participar en la regulación de la actina y, por ende, en la morfología celular.

Referencias

Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M. M., & Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2), 337-350.

Alberts, B. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). New York, NY: Garland Science.

Alonso, B., Beraud, C., Meguellati, S., Chen, S. W., Pellequer, J. L., Armengaud, J., & Godon, C. (2013). Eukaryotic GPN-loop GTPases paralogs use a dimeric assembly reminiscent of archaeal GPN. *Cell Cycle*, 12(3), 463-472.

Campellone, K. G., Lebek, N. M., & King, V. L. (2023). Branching out in different directions: Emerging cellular functions for the Arp2/3 complex and WASP-family actin nucleation factors. *European journal of cell biology*, 102(2), 151301.

Calera, M. R., Zamora-Ramos, C., Araiza-Villanueva, M. G., Moreno-Aguilar, C. A., Peña-Gómez, S. G., Castellanos-Terán, F., ... & Sánchez-Olea, R. (2011). Parcs/Gpn3 is required for the nuclear accumulation of RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(10), 1708-1716

Carré, C., & Shiekhatar, R. (2011). Human GTPases associate with RNA polymerase II to mediate its nuclear import. *Molecular and Cellular Biology*, 31(19), 3953–3962.

Dominguez, R. (2016). The WH2 domain and actin nucleation: necessary but insufficient. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(6), 478-490.

ELM (Eukaryotic Linear Motif resource). (2022). *WH2 domain*. Recuperado de http://elm.eu.org/cgimodel.py?fun=smartResult&userId=QiKP3S4B_h&EXPECT_CUTOFF=100&r=1&bg=on y http://elm.eu.org/cgimodel.py?fun=smartResult&userId=QiKP3S3yMi&EXPECT_CUTOFF=100&r=1&bg=on

ESM Metagenomic Atlas. (2023). Recuperado de <https://esmatlas.com/resources?action=fold>

Forget, D., Lacombe, A. A., Cloutier, P., Al-Khoury, R., Bouchard, A., Lavallée-Adam, M., ... & Coulombe, B. (2010). The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(12), 2827-2839.

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., ... & Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-391.

New England Biolabs. (2023). *NEB primer design tool*. Recuperado de <https://www.neb.com/tools-and-resources/primer-design>

Paunola, E., Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2002). WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Letters*, 513(1), 92-97.

Renault, L. (2016). Intrinsic, functional, and structural properties of β -thymosins and β -thymosin/WH2 domains in the regulation and coordination of actin self-assembly dynamics and cytoskeleton remodeling. *Vitamins and hormones*, 102, 25-54.

RCSB Protein Data Bank. (2023). *PDB entry 2A41*. Recuperado de <https://www.rcsb.org/structure/2A41>

Shekhar, S., Pernier, J., & Carlier, M. F. (2016). Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *Journal of cell science*, 129(6), 1085-1091.

Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastitis, P. L., Karaca, E., ... & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428 (4), 720-725.

Xue, B. & Robinson, R. C. (2016). Actin-induced structure in the beta-thymosin family of intrinsically disordered proteins. *Vitamins and Hormones*, 102, 55-71.

Zuchero, J. B., Belin, B., & Mullins, R. D. (2012). Actin binding to WH2 domains regulates nuclear import of the multifunctional actin regulator JMY. *Molecular biology of the cell*, 23(5), 853-863.

Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B. L., & Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature cell biology*, 11(4), 451-459.

Pies de figura

Figura 1. Modelo de acoplamiento molecular entre Gpn3 y G-actina. En la imagen se observa a Gpn3 en color verde y la actina globular en color beige. El dominio WH2 de Gpn3, que interactúa con G-actina, está resaltado en rojo con un mesh alrededor de los residuos clave. El modelo fue generado utilizando ChimeraX.

Figura 2. Confirmación de la construcción molecular Gpn3RFlag-L69A/R70A y subclonación. Secuenciación de la construcción molecular Gpn3RFlag-L69A/R70A, **A)** donde se muestra la comparación entre la secuencia de la proteína Gpn3 (inferior) y la secuencia mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A (superior), en la que se introdujeron las mutaciones L69A y R70A mediante mutagénesis sitio dirigida. La sustitución de leucina y arginina por alaninas en las posiciones 69 y 70, respectivamente, fue confirmada mediante secuenciación de ADN, validando la correcta introducción de las mutaciones específicas. **B)** Digestión de la construcción Gpn3RFlag-L69A/R70A en el vector pEYFP y Gpn3RFlag en el vector pLNCX2 para subclonación. El gel de electroforesis muestra los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión enzimática para su posterior subclonación y análisis funcional.

Figura 3. Generación y validación de las líneas celulares MCF-12A expresando variantes de Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A con supresión de la expresión endógena de Gpn3 mediante shRNA. Las imágenes **A)** y **B)** muestran la eficiencia de las partículas retrovirales generadas en células HEK293T para la sobreexpresión de Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A, respectivamente, evaluadas por la fluorescencia de GFP. Las imágenes **C)** y **D)** representan la eficiencia de las partículas retrovirales para la expresión de shRNA g193 (que reduce la expresión endógena de Gpn3) y el control shRNA g239. En **E)**, se presenta un análisis de Western blot que confirma la expresión de Gpn3RFlag y su variante mutante Gpn3RFlag-L69A/R70A en las líneas celulares MCF-12A, así como la reducción de la expresión de Gpn3 endógena en presencia del shRNA g193.

Figura 4. Evaluación de la formación de lamelipodios en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A bajo diferentes condiciones de estímulo. Las imágenes **A)** y **C)** muestran las células después de 4 horas de ayuno y estímulo con medio de ayuno durante 30 y 60 minutos, respectivamente. Las imágenes **B)** y **D)** corresponden a las células estimuladas con medio completo durante 30 y 60 minutos. En estas últimas condiciones, se observan los lamelipodios (amarillo) y la actina filamentosa (rosa), indicados por flechas. La imagen **E)** presenta un gráfico cuantitativo del número de células con lamelipodios en cada condición experimental.

Figura 5. Evaluación de la migración celular en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag y Gpn3RFlag-L69A/R70A bajo diferentes condiciones de estímulo. A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de herida, donde se observa el área delimitada en amarillo, utilizada para cuantificar la migración celular en cada condición: medio de ayuno por 4 h, medio completo por 4 h, medio de ayuno por 8 h, y medio completo por 8 h. B) Gráfico cuantitativo que muestra el área total medida en cada condición experimental. Los resultados indican que el área de cierre de herida fue significativamente menor en las condiciones de ayuno en comparación con las de medio completo, lo que refleja una disminución en la capacidad migratoria bajo condiciones de restricción de nutrientes. No se observaron diferencias significativas entre las distintas líneas celulares evaluadas.

Figura 6. Evaluación de la localización subcelular de Gpn3 y su co-localización con lamelipodios en las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag g193, Gpn3RFlag g239, Gpn3RFlag-L69A/R70A g193, y Gpn3RFlag-L69A/R70A g239 bajo condiciones de medio de ayuno y medio completo a 30 y 60 minutos. Las imágenes superiores muestran la fluorescencia correspondiente a Gpn3 en verde. Las imágenes del medio muestran la tinción nuclear con DAPI en azul. Las imágenes inferiores representan la combinación de ambas señales (superposición) para evaluar la co-localización. Se observó que Gpn3 co-localiza con los lamelipodios en todas las líneas celulares cuando se utilizó medio completo, mientras que, bajo condiciones de ayuno, especialmente en la línea Gpn3RFlag-L69A/R70A g193, Gpn3 mostró una distribución tanto citoplasmática como nuclear, acompañada de alteraciones en la morfología celular en comparación con las demás líneas.

Tabla 1. Parámetros del acoplamiento molecular entre Gpn3 y G-actina obtenidos en HADDOCK 2.4

Parámetro	Valor
HADDOCK score	93.4 $\pm$ 7.2
Tamaño del clúster	13
RMSD desde la estructura de menor energía	12.1 $\pm$ 0.0
Energía de Van der Waals	-45.3 $\pm$ 1.1
Energía electrostática	-448.9 $\pm$ 30.8
Energía de desolvatación	21.9 $\pm$ 2.6
Energía de violación de restricciones	2065.1 $\pm$ 56.4
Área de superficie enterrada	1952.0 $\pm$ 28.1
Z-Score	-2.1

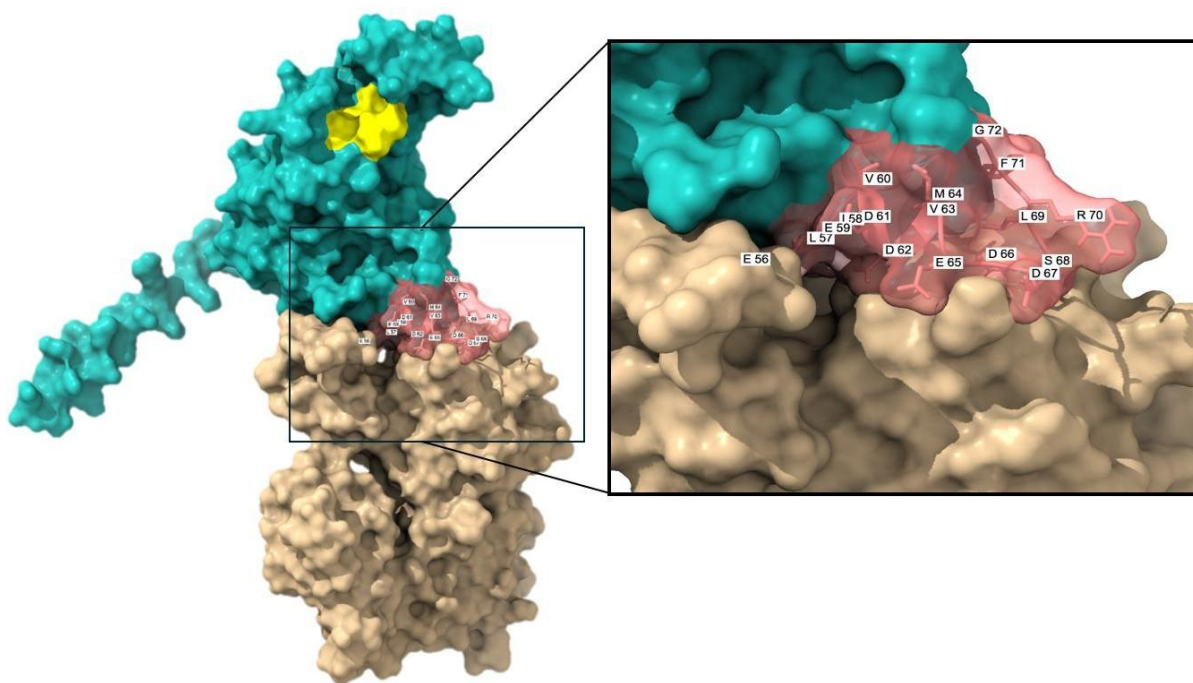
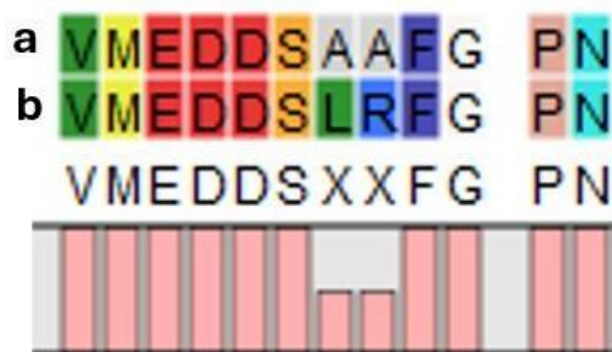


Figura 1

A)



B)

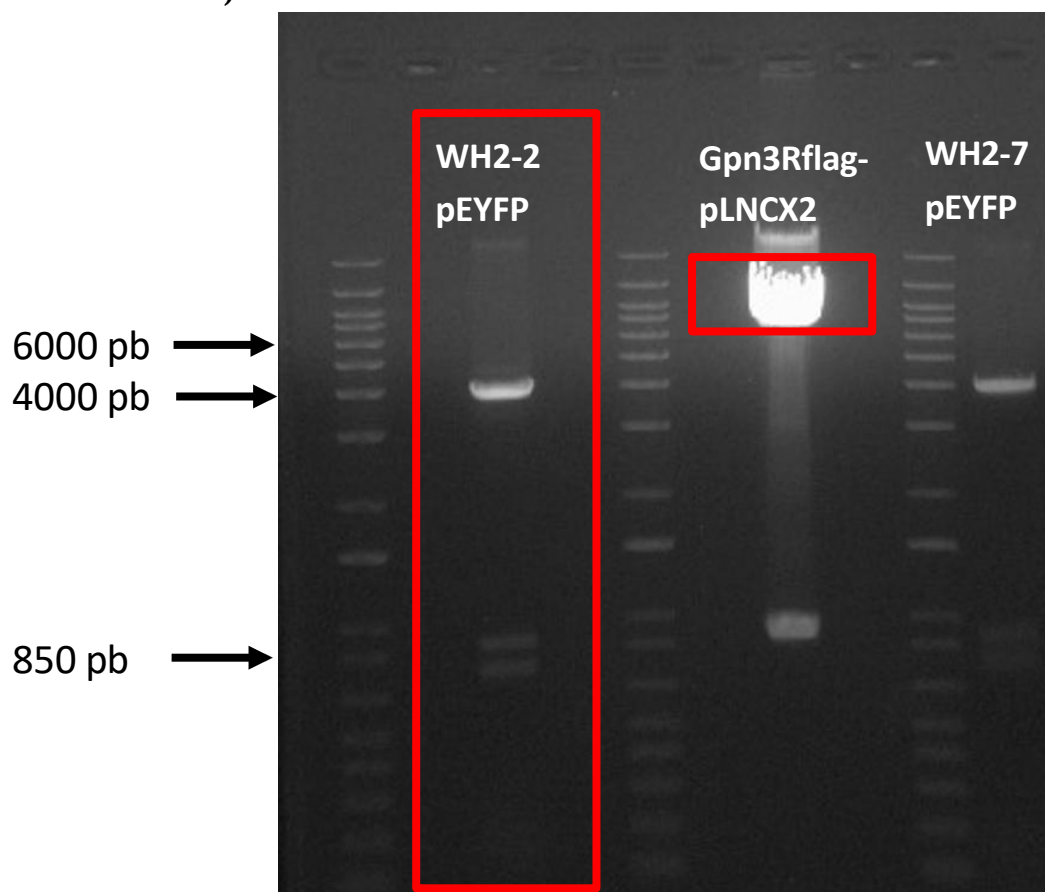


Figura 2

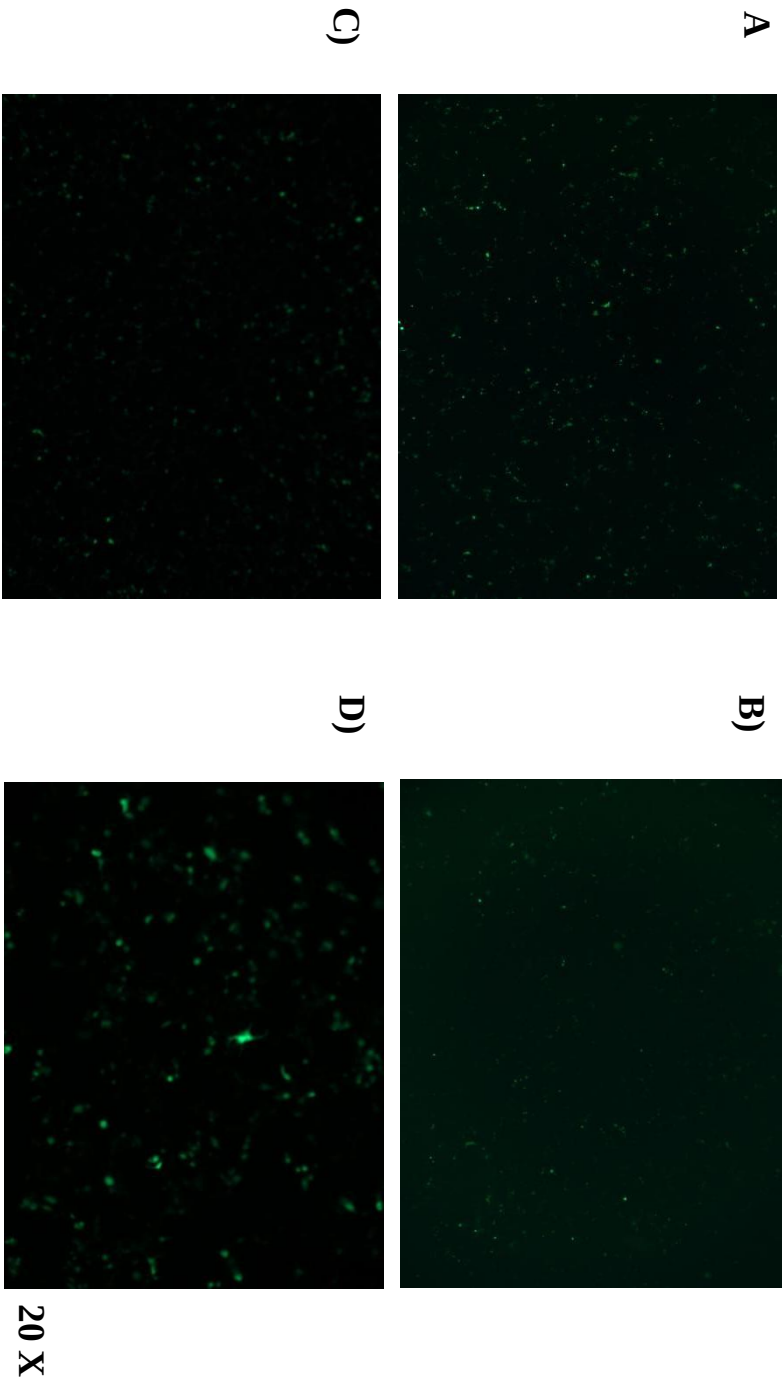


Figura 3

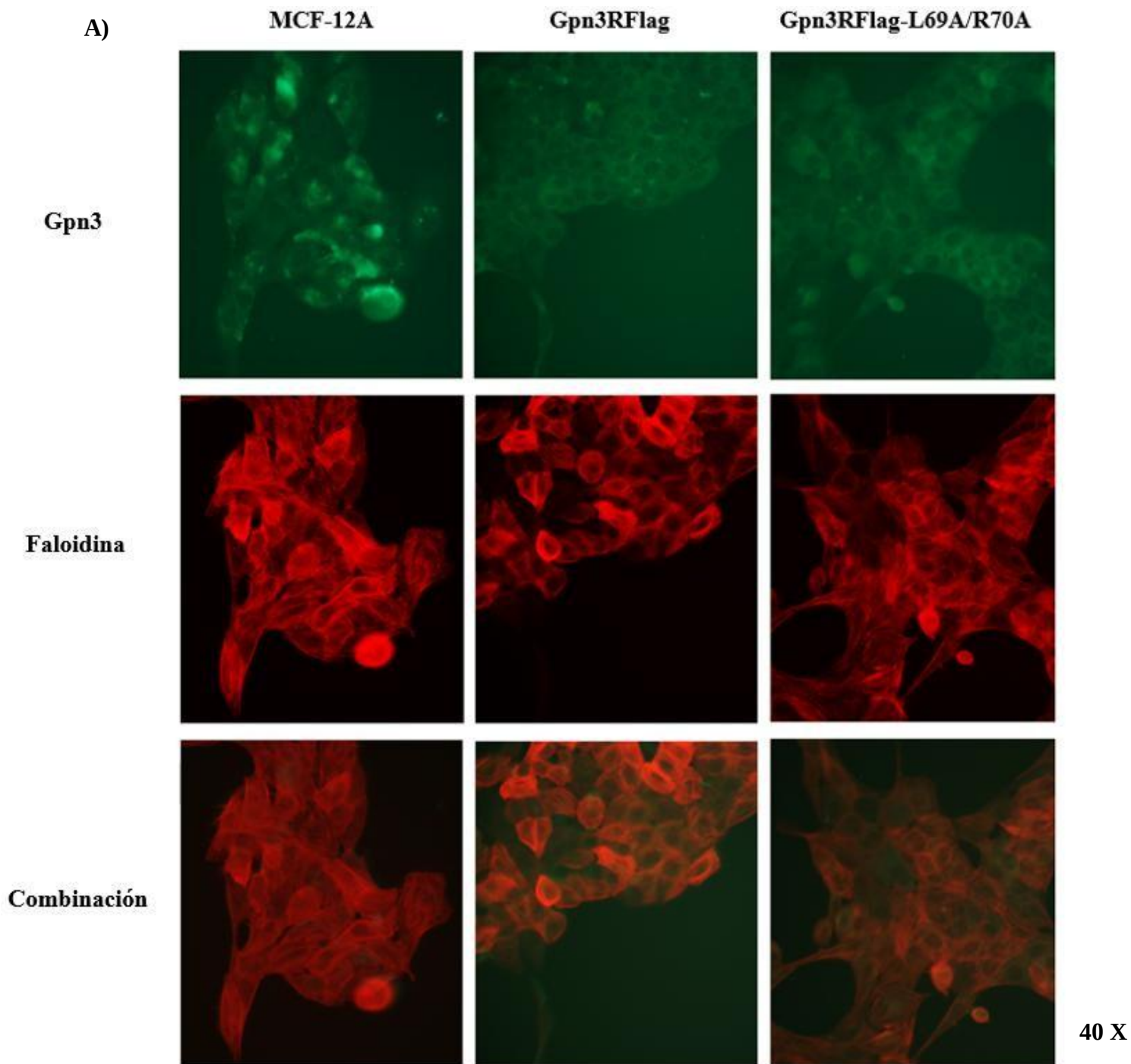


Figura 4

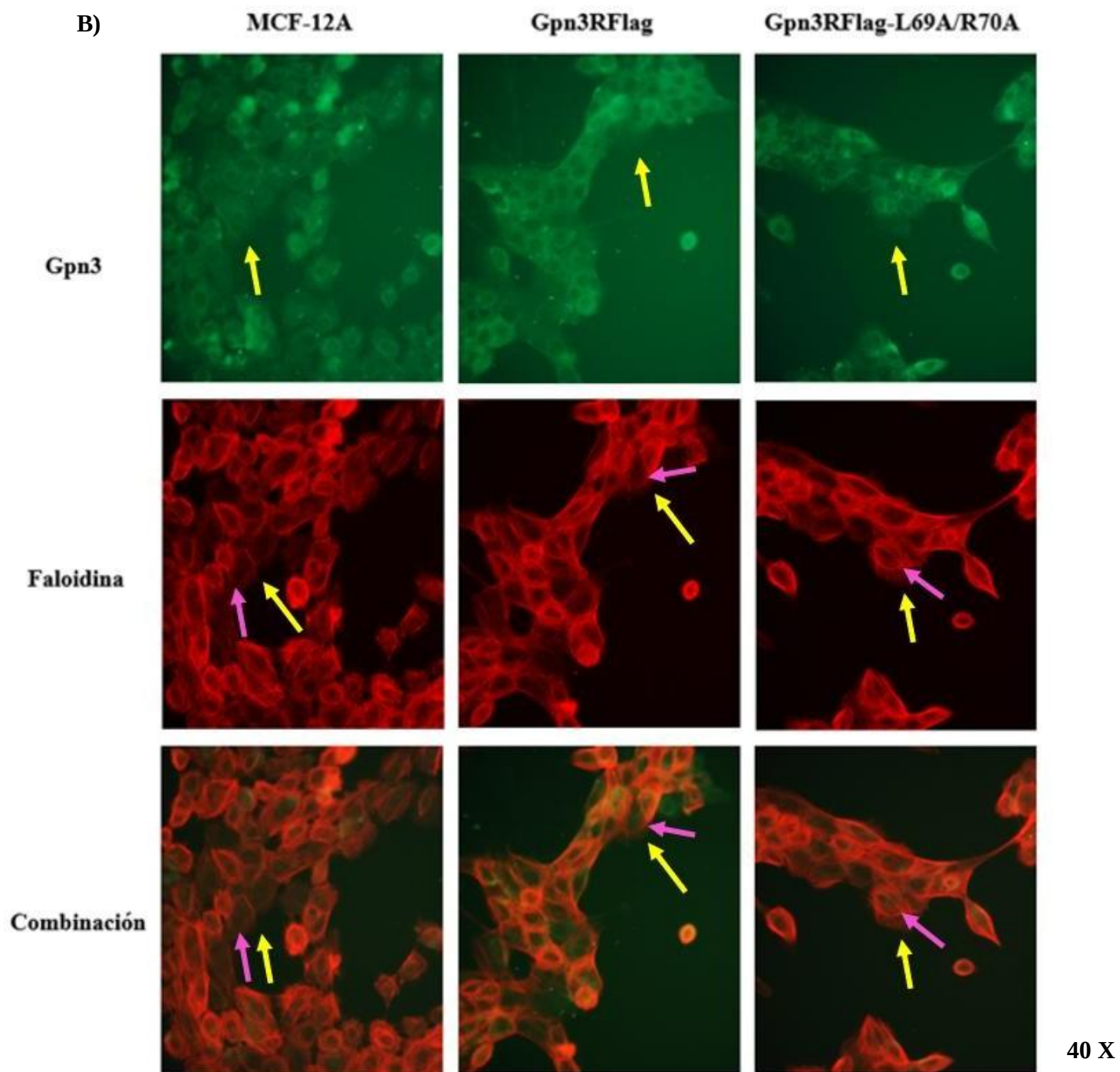


Figura 4

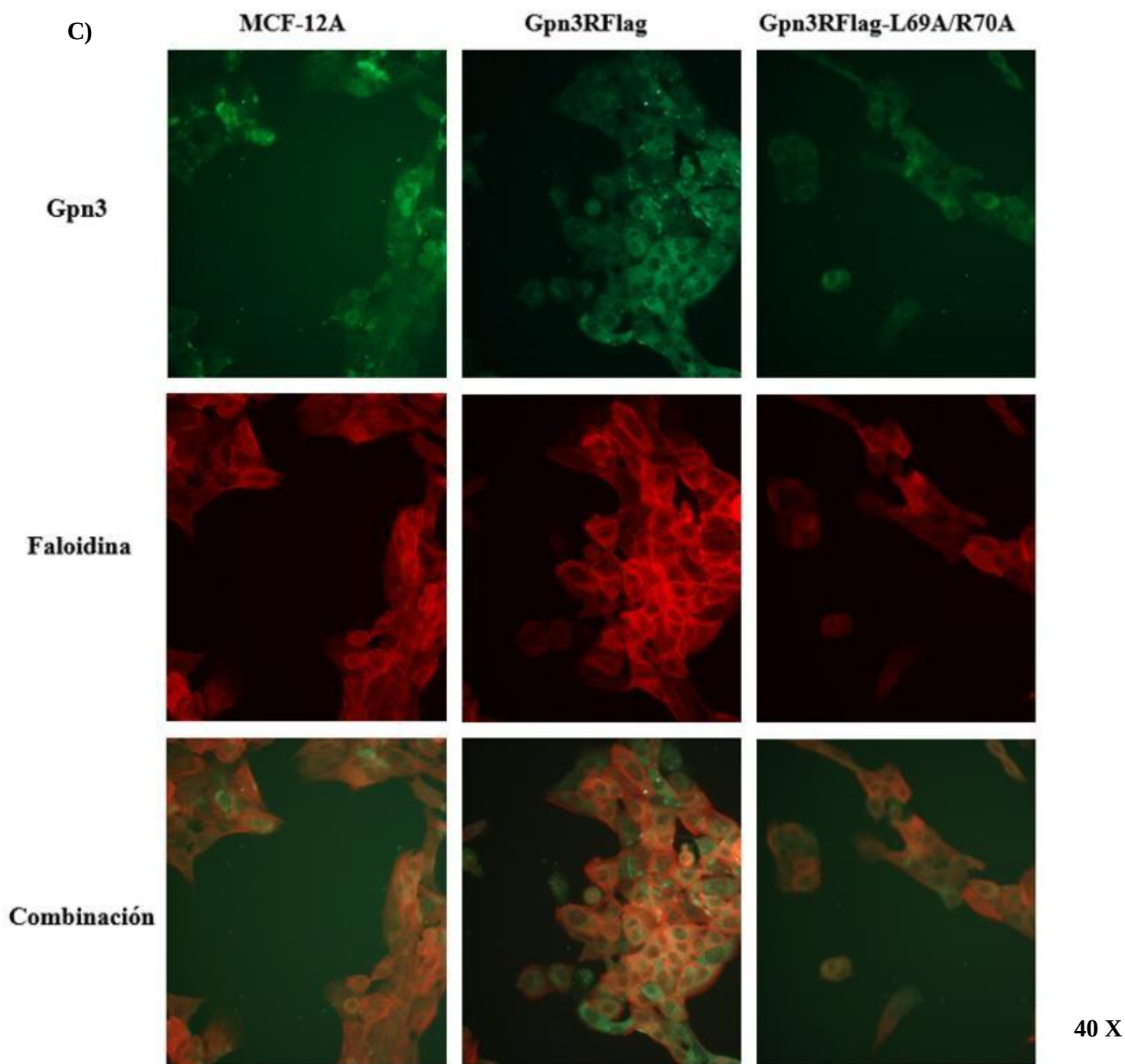


Figura 4

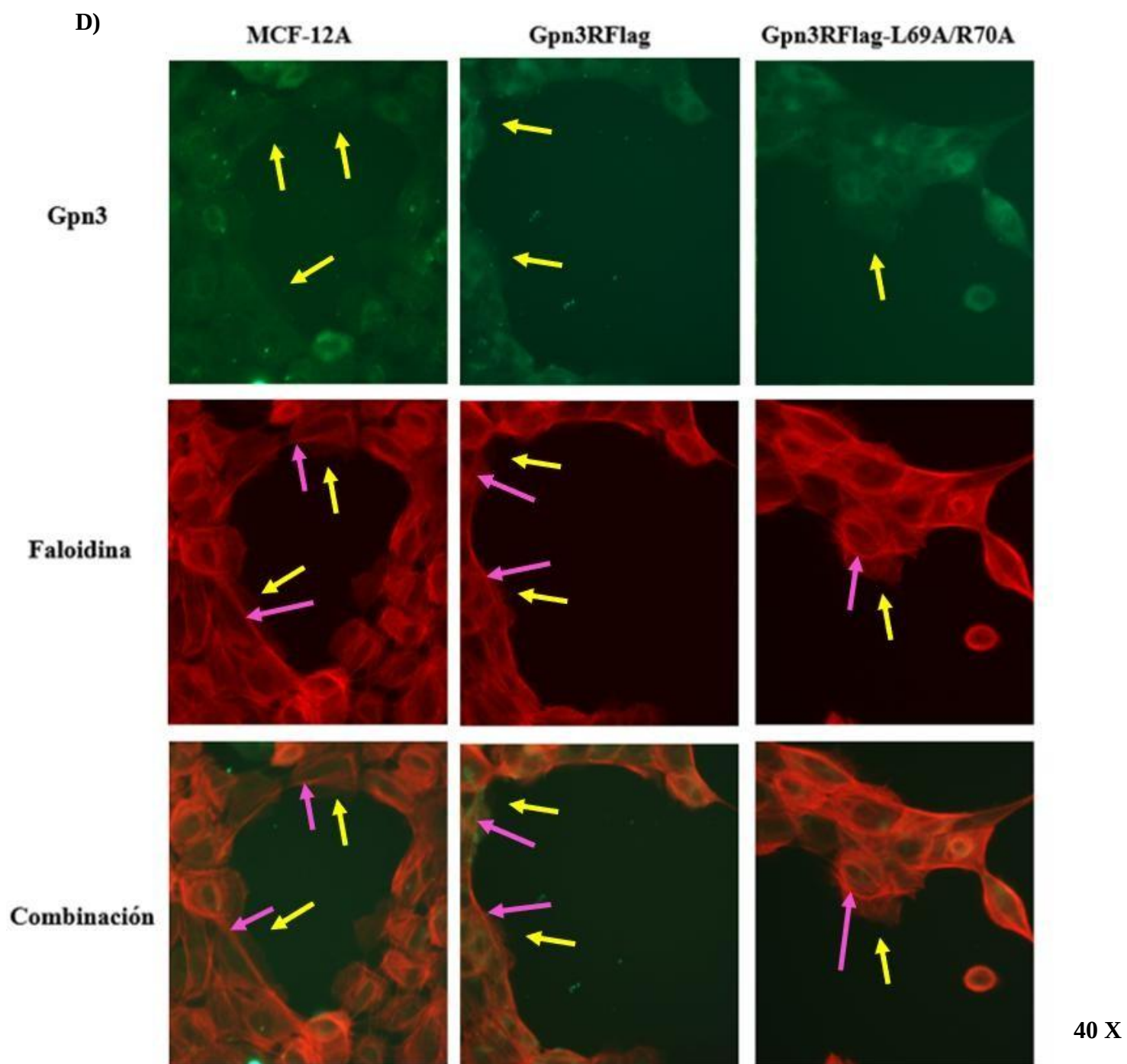


Figura 4

E)

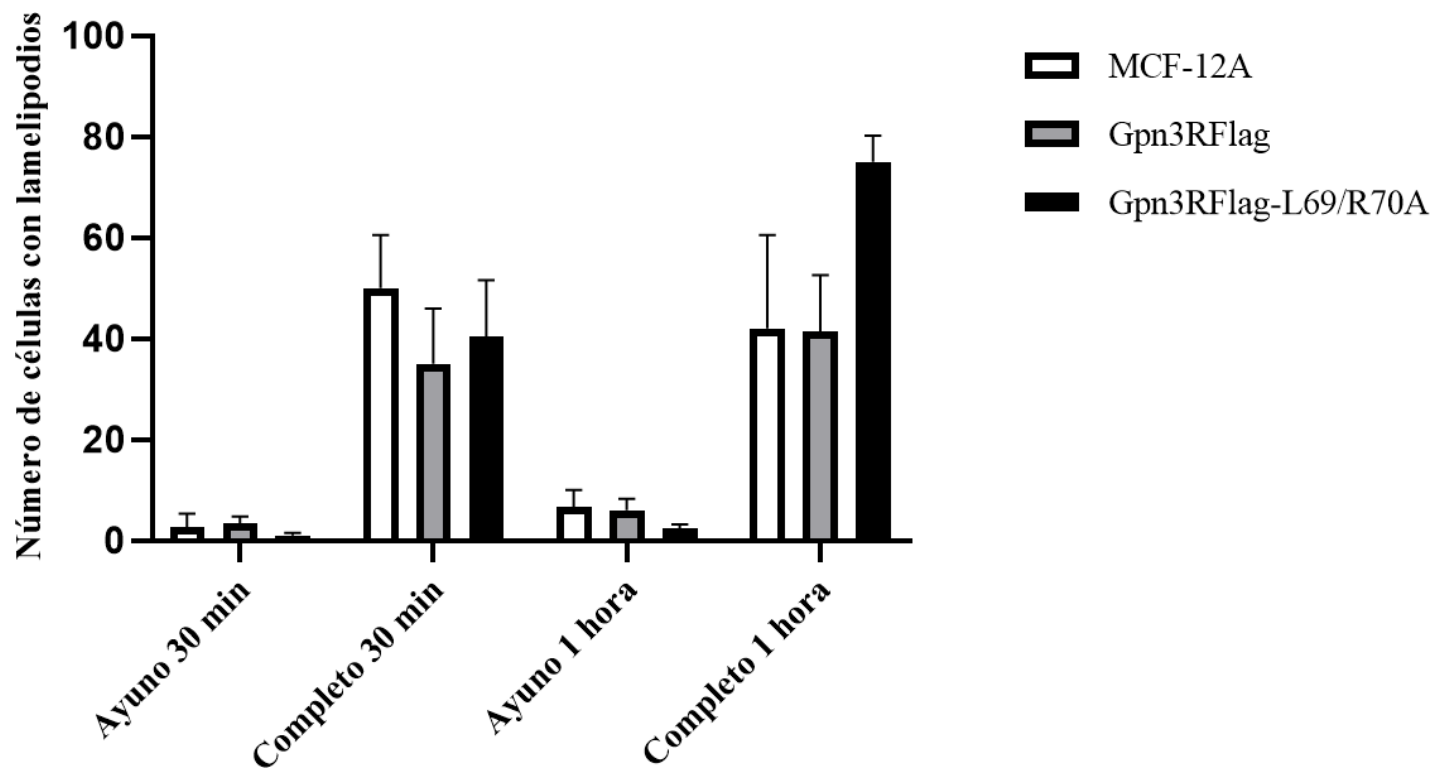
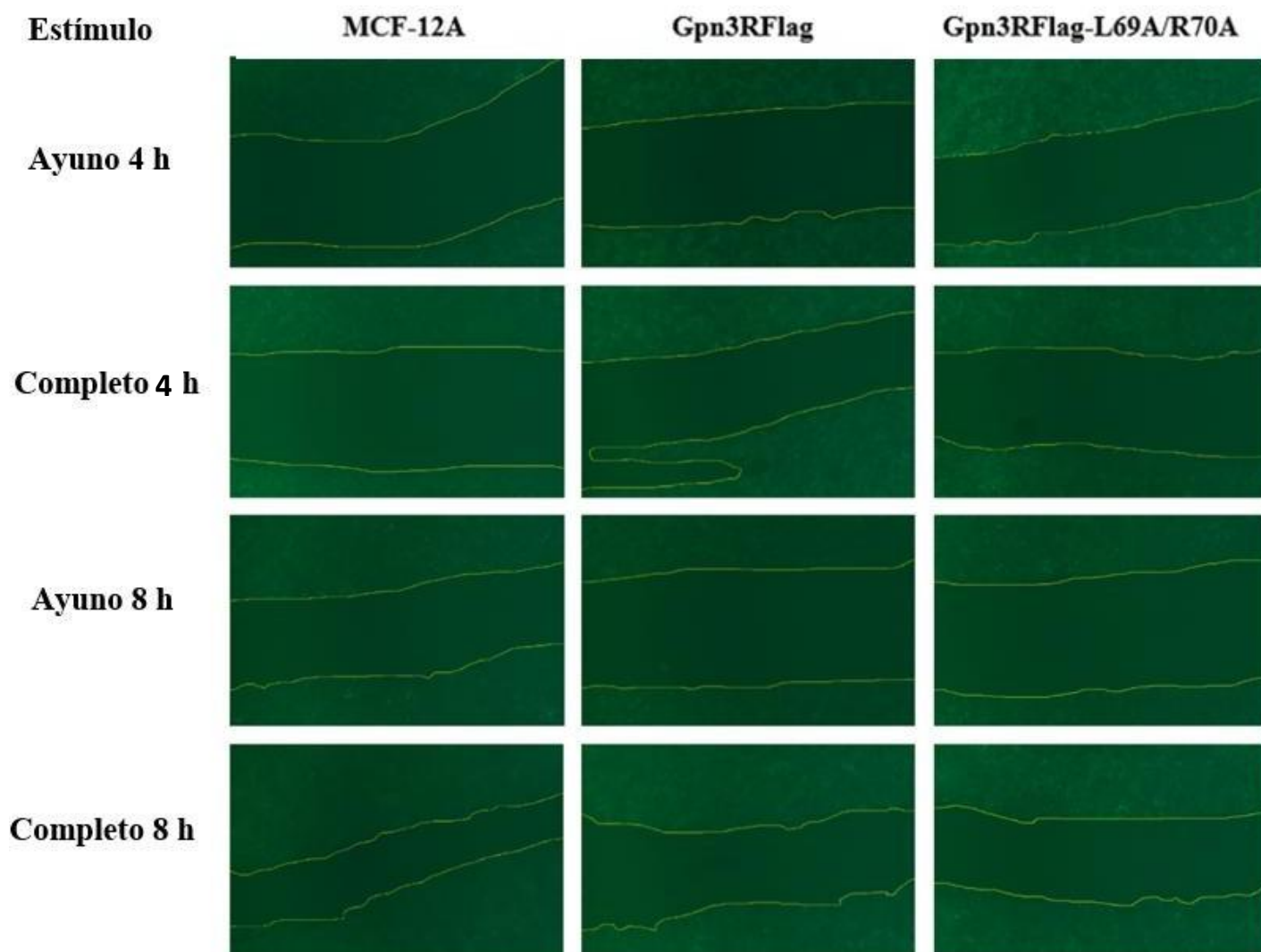


Figura 4

A)



20 X

Figura 5

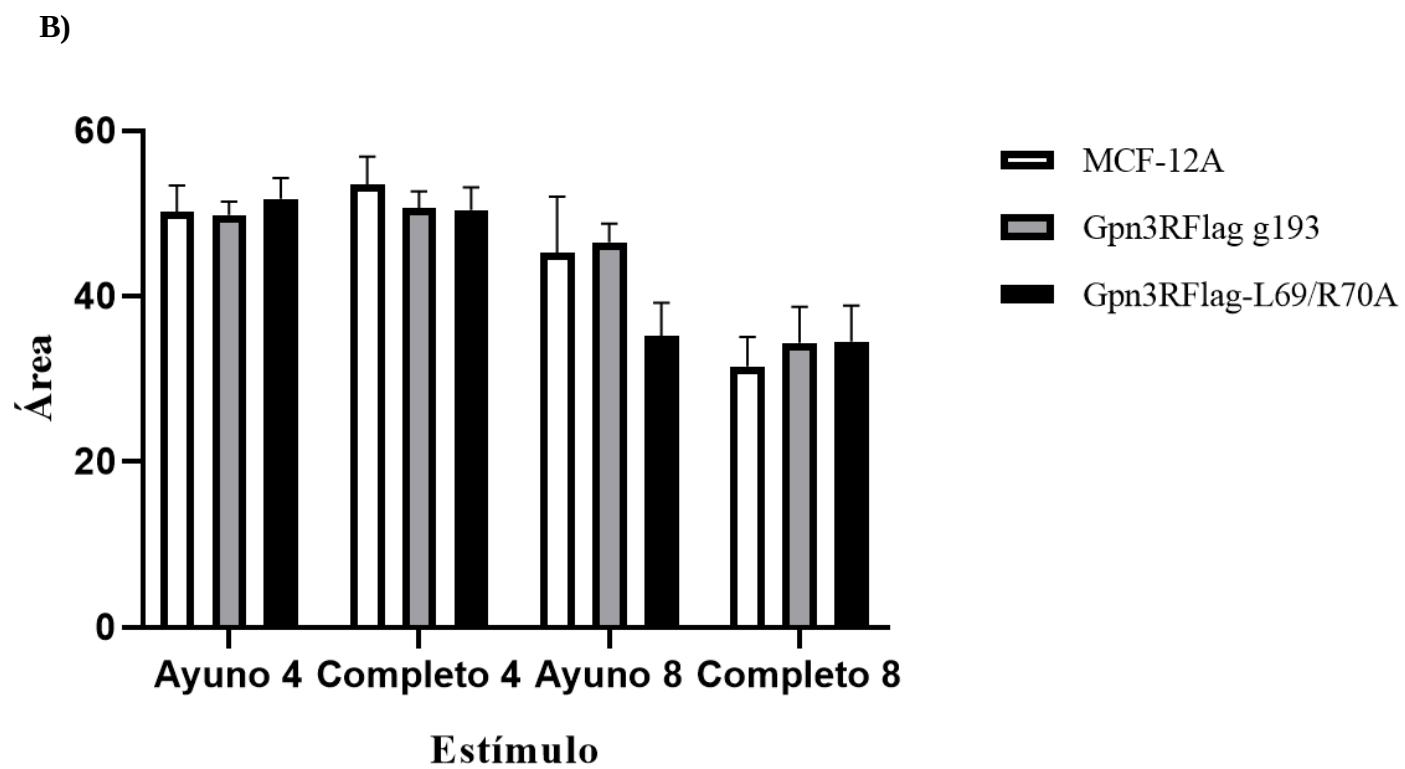


Figura 5

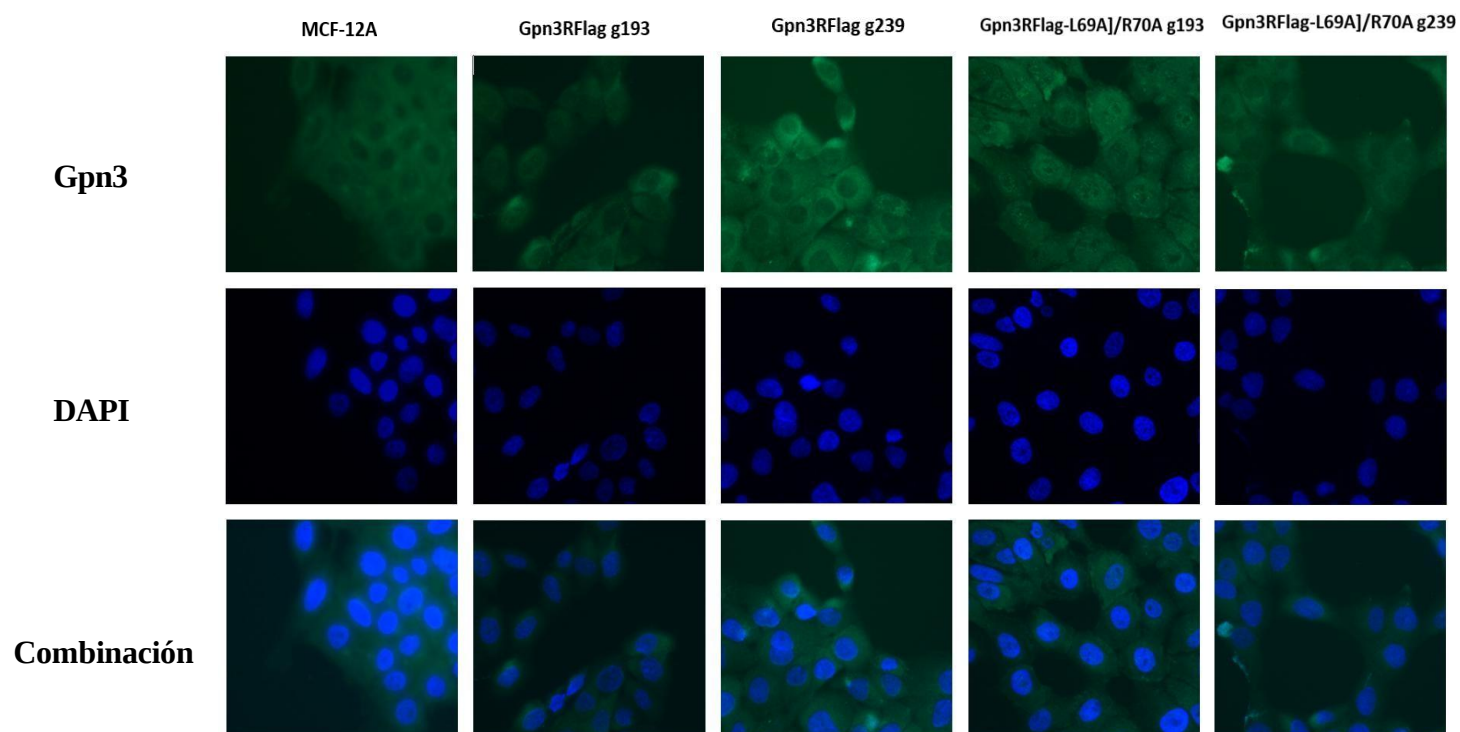


Figura 6

40 X



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
PCBB



Importancia de la GTPasa Gpn3 en la formación y función de los lamelipodios en las células humanas de mama MCF-12A

Lic. en Biología José Carlos Boris Rodríguez Khazina

Co-Directores de tesis:
Dr. Roberto Sánchez Olea
Dra. Mónica Raquel Calera Medina

Asesoras:
Dra. Esther Layseca Espinosa
Dra. Othir Gidaltí Galicia Cruz



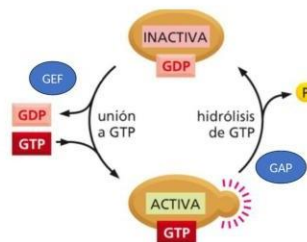
1

INTRODUCCIÓN

2

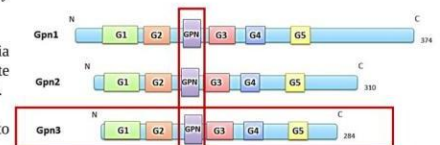
Las GTPasas son interruptores moleculares

- Unen GDP y GTP e hidrolizan GTP.
- Proteínas reguladas por los GEFs (Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) y las GAPs (Proteína activadora de la actividad de GTPasa).
- Implicadas en diversos procesos celulares:
 - Tráfico vesicular.
 - Síntesis de proteínas.
 - Migración celular.
 - Metástasis en el cáncer.

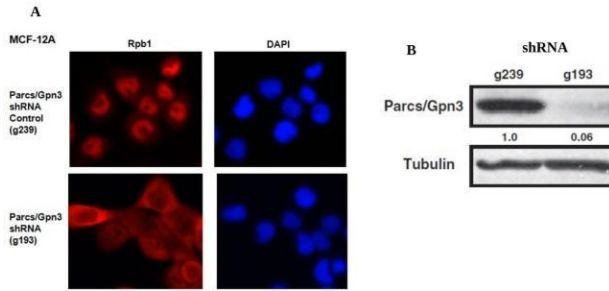


La familia de las GTPasas GPN contienen el motivo característico Glicina-Prolina-Asparagina (GPN)

- Está constituida por Gpn1, Gpn2 y Gpn3.
- Los tres miembros de esta familia son esenciales y evolutivamente conservados en células eucariotas.
- En arqueas se ha descrito solamente una GTPasa GPN.



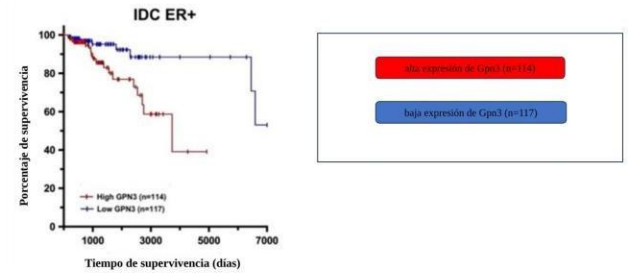
Gpn3 es necesaria para la acumulación nuclear de la RNA polimerasa II



Calera *et al.*, 2011. BBA-Mol Cell Res. 1813(10):1708-1716.

5

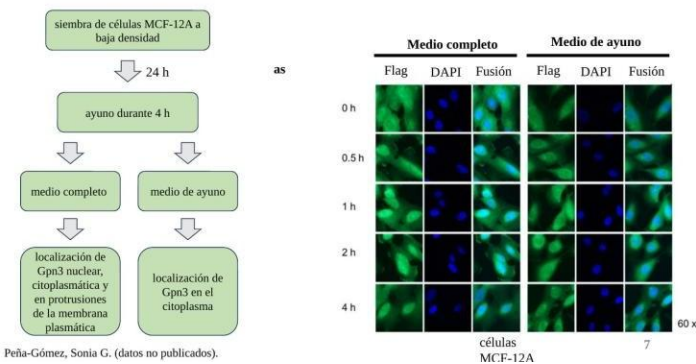
La sobreexpresión de Gpn3 es un marcador de pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama



Modificado de Lara-Chacón *et al.*, 2019. Technol Cancer Res. 18(1):1-11.

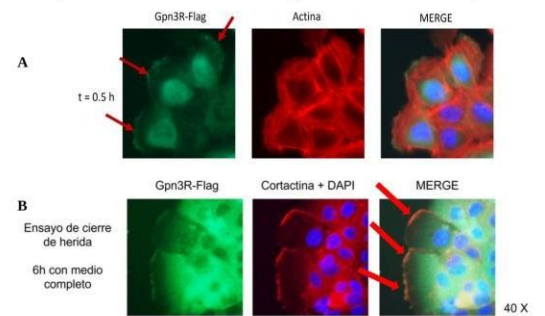
6

Gpn3 se moviliza a protrusiones en el límite de la célula que se asemejan a lamelipodios



Peña-Gómez, Sonia G. (datos no publicados).

Gpn3 colocaliza con la cortactina, marcador de los lamelipodios



Peña-Gómez, Sonia G. (datos no publicados).

8

Los lamelipodios son estructuras dinámicas de la membrana plasmática

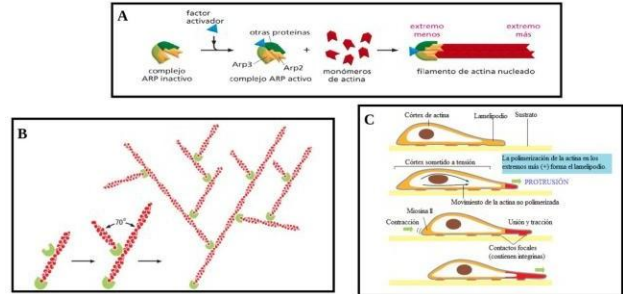
Son necesarios para diversos procesos:

- Migración celular por cierre de herida.
- Migración de células del sistema inmune.
- Migración en el desarrollo embrionario.



Modificado de Chen *et al.*, 2018. *Front. Phys.* 9 ; Innocenti, 2018. *Cell Adh Migr.* 12(5):401-416.

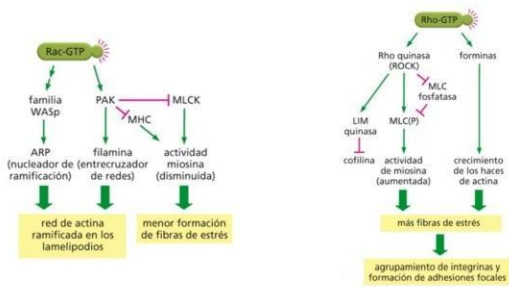
Los lamelipodios se forman por la polimerización de actina monomérica ramificada y funcionan en la migración celular



Modificado de Alberts *et al.*, 2015. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 1464.

10

Las GTPasas Rac y Rho son reguladores críticos de la migración celular



Modificado de Alberts *et al.*, 2015. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 1464.

El análisis de Gpn3 por ELM predice un motivo de unión a actina (WH2)

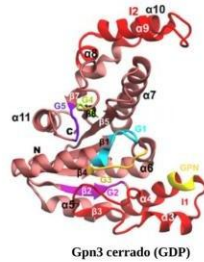


Secuencia consenso WH2	[R] ₁ [L] ₂ ([ILMFV]) ₃ ([ILMFV]) ₄ [P] ₅ [P] ₆ [ILMY] ₇ (4,7) ₈ [L] ₉ ([KR]) ₁₀ (NK) ₁₁ [VATIG] ₁₂
Motivo putativo WH2 en Gpn3	56-ELIEVDDVMEDDS ₅₇ LR FG-72
GPN3 XP_003302547.1	A. queenslandica PAA---EAFNYPVTVTRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86
GPN3 XP_5479393	A. thaliana PAA---EIVFPVAVNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 84
GPN3 XP_00108555.1	T. adhaerens PAA---EIVFPVAVNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86
GPN3 XP_0290851	H. sapiens PAA---EAFNYVSNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 87
GPN3 XP_03222793.8	A. carolinensis PAA---EAFNYVSNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 87
GPN3 XP_0252790.2	G. gallus PAA---EIVFPVAVNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86
GPN3 XP_001084649.1	X. laevis PAA---EAFNYVPLVRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 87
GPN3 Q62681	D. rerio PAA---EIVFPVAVNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86
GPN3 XP_002558566.1	P. gordonii PAA---EIVFPVAVNRELVLQVQDMSGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86
GPN3 XP_001034244.1	N. vectensis PAA---EERTYVVALCIRELVLEVMASGSGVLPVHSGGLICMVELVGN 86

elm.eu.org

12

El motivo WH2 se localiza en la inserción 1 de Gpn3



Gpn3 cerrado (GDP)

aa. 41- AAEHFNYSVMADIRELIEVDDVMEDDSLRFGPNGGGLVFCMEYF-

Mol Cell Biol., 2016. 36(5):820-31; Cristóbal-Mondragón *et al.*, 2019. FEBS J. 286(23):4797-4818.

13

Justificación

Datos preliminares de nuestro grupo mostraron que Gpn3 se localiza en estructuras de la membrana plasmática que son positivas a cortactina, lo que apoya la propuesta de que corresponden a lamelipodios.

En ELM se predice la presencia de un motivo de unión a actina WH2 en Gpn3 y un motivo de unión al WRC, el cual interactúa con factores activadores del complejo ARP 2/3, los cuales llevan a cabo la polimerización de actina. Se desconoce la relevancia de Gpn3 en la formación y función de los lamelipodios, estructuras responsables de la migración celular.

14

Hipótesis

Gpn3 es una GTPasa esencial para la formación y función de los lamelipodios en las células de mama MCF-12A.

15

Objetivo general

Determinar la importancia de la GTPasa Gpn3 en la formación y la función de los lamelipodios en las células MCF-12A.

16

Objetivos específicos

- 1. Generar un modelo de acoplamiento *in silico* del posible motivo WH2 de la GTPasa Gpn3 con la actina globular.
- 2. Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios en las células MCF-12A.
- 3. Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la migración de las células MCF-12A.
- 4. Determinar la localización subcelular de la mutante Gpn3 L69A/R70A.

17

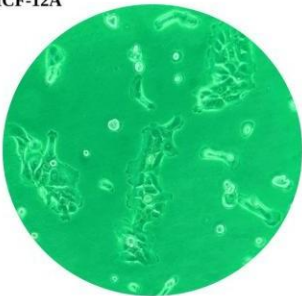
Estrategia Experimental y Resultados

18

Células de mama MCF-12A

- Células epiteliales humanas de mama no tumorigénicas.
- Incubadas a 37°C, en un ambiente con 5% de CO₂.
- Las células MCF-12A se cultivan en medio DMEM F-12.

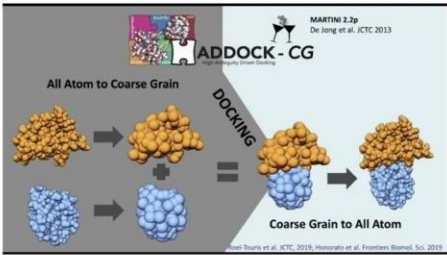
componentes	medio completo	medio de ayuno
suero de caballo (HS)	+	-
insulina	+	-
factor de crecimiento endotelial (EGF)	+	-
toxina del cólera	+	+
hidrocortisona	+	+
antibióticos: penicilina, estreptomina	+	+



- Para efectuar el proceso de resiembra en esta línea celular, se utiliza tripsina al 0.25% de EDTA durante 20 min.

19

Objetivo 1: Generar un modelo de acoplamiento *in silico* del posible motivo WH2 de la GTPasa Gpn3 con la actina globular.



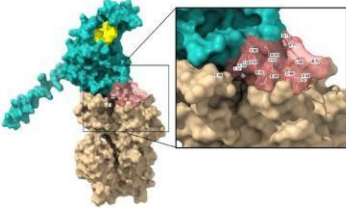
En colaboración con el Dr. Julio Alberto Muñiz Luna.

20

El acoplamiento molecular sugiere una posible interacción entre el motivo WH2 de Gpn3 y la actina globular

Tabla 1. Parámetros del acoplamiento molecular entre Gpn3 y G-actina obtenidos en el servidor Haddock 2.4.

Parámetro	Valor
HADDOCK score	93.4 ± 7.2
Tamaño del cluster	13
RMSD desde la estructura de menor energía	12.1 ± 0.0
Energía de Van der Waals	-45.5 ± 1.1
Energía electrostática	-448.9 ± 30.8
Energía de desolvatación	21.9 ± 2.6
Energía de violación de restricciones	2065.1 ± 164
Área de superficie enterrada	1952.0 ± 28.1
2-Score	-2.1

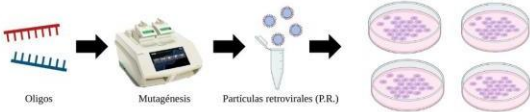


*En colaboración con el Dr. Julio Alberto Muñiz Luna

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

Generación de líneas celulares

Línea celular	Gpn3 endógena	Gpn3 exógena	Propósito
Gpn3RFlag g193	Disminuida	Silvestre	Reemplazo con Gpn3 silvestre
Gpn3RFlag g239	Presente	Silvestre	Control de sobreexpresión silvestre
Gpn3RFlag-L69A/R70A g193	Disminuida	Mutante	Evaluar funcionalidad de la mutante
Gpn3RFlag-L69A/R70A g239	Presente	Mutante	Control de sobreexpresión mutante



Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

Meta 1: Diseñar y generar oligonucleótidos para introducir la doble mutación L69A/R70A en el motivo WH2 en Gpn3.

- Uso de la herramienta digital QuickChange Primer Design (Agilent Technologies).
- Síntesis de los oligonucleótidos (T4 OLIGO).



Gpn3-WH2 sentido	5' gatgaatggaggatgattctgcggcattcgtcccaacggaggatt 3'
Gpn3-WH2 antisentido	5' aatcctcgttgggaccgaatgccgagatcatctccattacatc 3'



Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

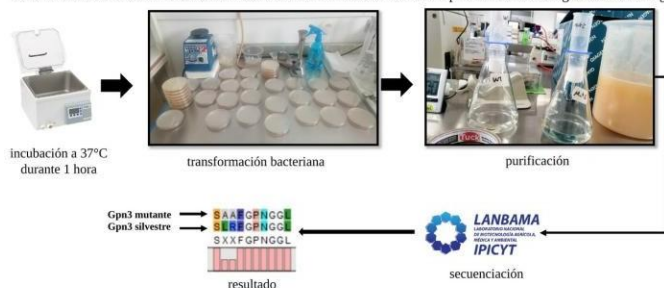
Meta 2: Introducir la doble mutación L69A/R70A en el motivo WH2 en Gpn3 mediante mutagénesis sitio-dirigida.

construcción molecular Gpn3R-pEYFP termociclador C-100 Thermal Cycler enzimas de restricción Dpn1



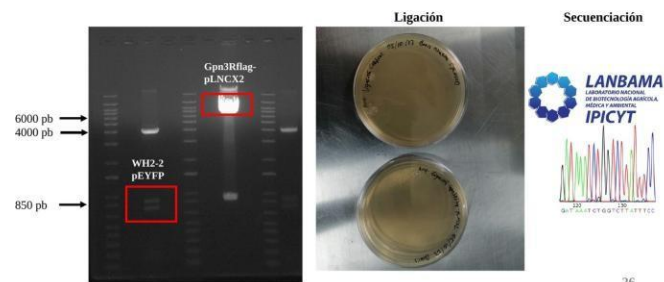
Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

Meta 2: Introducir la doble mutación L69A/R70A en el motivo WH2 en Gpn3 mediante mutagénesis sitio-dirigida.



25

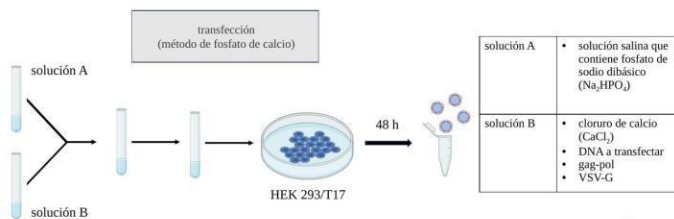
Subclonación de la secuencia codificante de Gpn3R o Gpn3R-WH2 (L69A/R70A) en el vector retroviral pLNCX2.



26

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

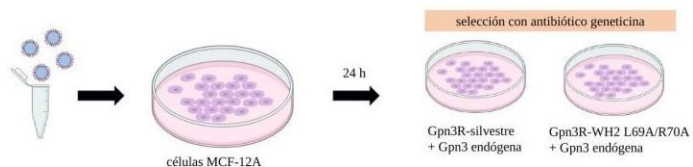
Meta 3: Generar partículas retrovirales para expresar Gpn3R y Gpn3R-WH2 L69A/R70A.



27

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios.

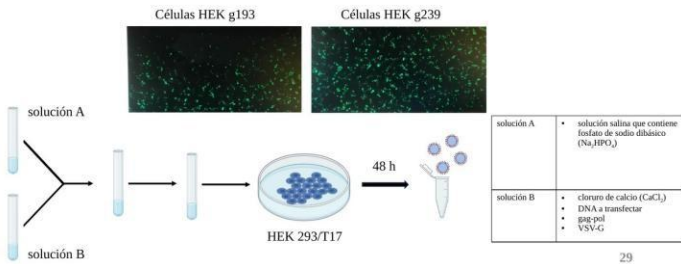
Meta 4: Generar líneas celulares MCF-12A que sobreexpresen Gpn3R/Gpn3R-WH2 (L69A/R70A) de manera estable.



28

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios

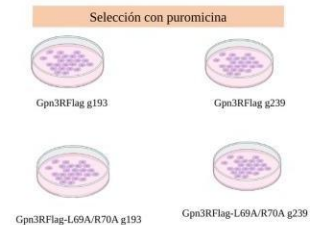
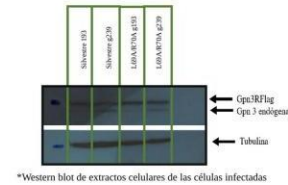
Meta 5: Suprimir la expresión de Gpn3 endógena utilizando la técnica de RNA de interferencia en las células que expresan establemente Gpn3R o Gpn3R-WH2 (L69A/R70A).



29

Supresión de la expresión de Gpn3 endógena a través de la técnica de RNA de interferencia en las células que expresan establemente Gpn3R o Gpn3R-WH2 (L69A/R70A)

Línea celular	Gpn3 endógena	Gpn3 exógena
Gpn3RFlag g193	Disminuida	Silvestre
Gpn3RFlag g239	Presente	Silvestre
Gpn3RFlag-L69A/R70A g193	Disminuida	Mutante
Gpn3RFlag-L69A/R70A g239	Presente	Mutante

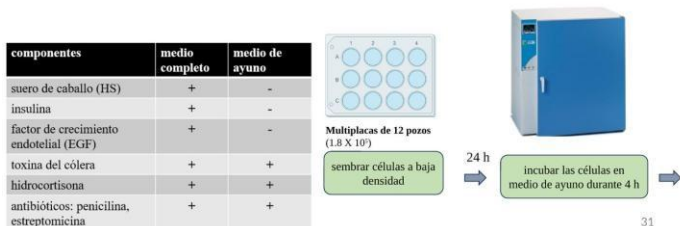


30

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios

Meta 6: Analizar la formación de lamelipodios en células MCF-12A que sobreexpresen Gpn3R y Gpn3R-WH2 por microscopía de fluorescencia.

Meta 7: Evaluar la importancia del motivo WH2 de Gpn3 en su translocación a los lamelipodios por microscopía de fluorescencia utilizando el marcador faloidina.



31

Objetivo 2: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la formación de los lamelipodios

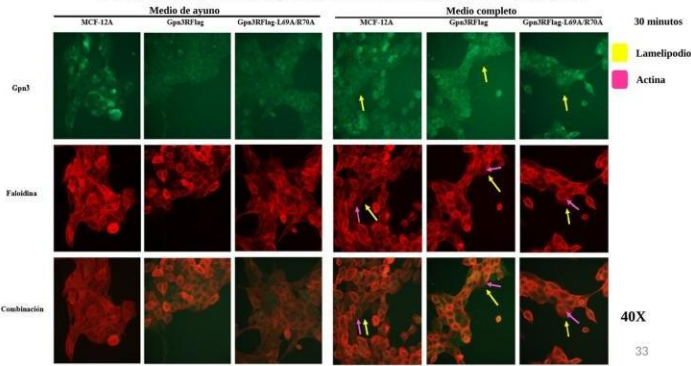
Meta 6: Analizar la formación de lamelipodios en células MCF-12A que sobreexpresen Gpn3R y Gpn3R-WH2 por microscopía de fluorescencia.

Meta 7: Evaluar la importancia del motivo WH2 de Gpn3 en su translocación a los lamelipodios por microscopía de fluorescencia utilizando el marcador faloidina.

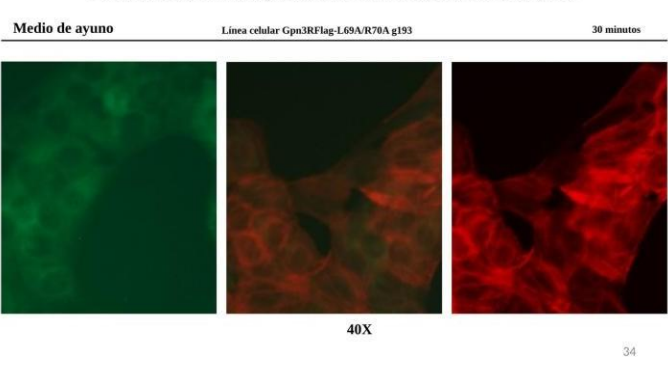


32

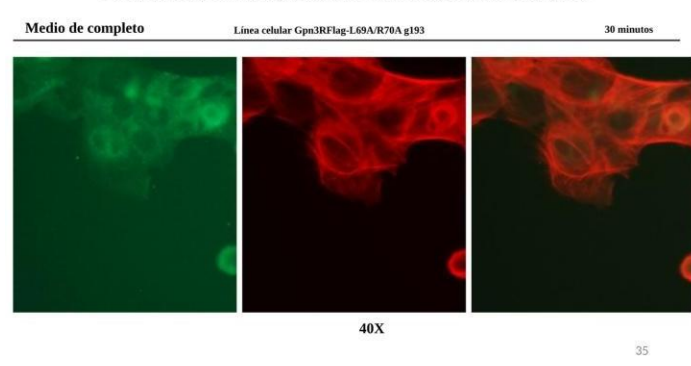
La formación de lamelipodios ocurre en todas las líneas celulares



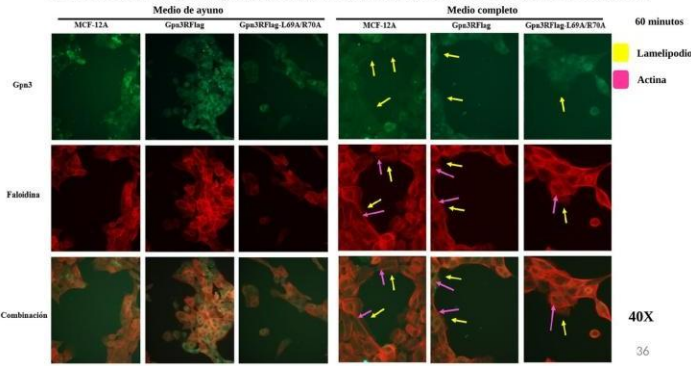
La formación de lamelipodios ocurre en todas las líneas celulares



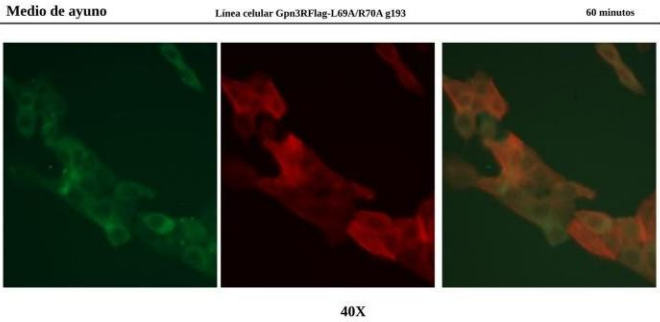
La formación de lamelipodios ocurre en todas las líneas celulares



La formación de lamelipodios ricos en actina ocurre en todas las líneas celulares

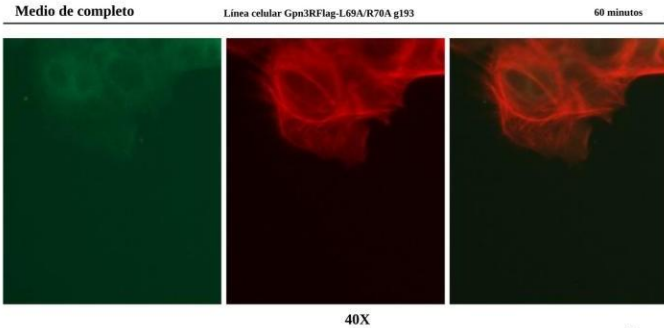


La formación de lamelipodios ocurre en todas las líneas celulares



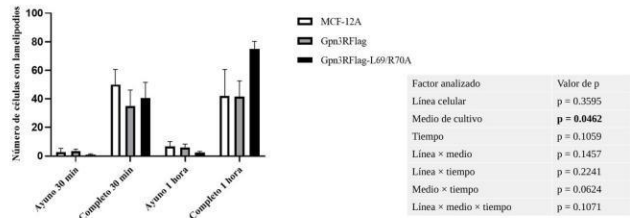
37

La formación de lamelipodios ocurre en todas las líneas celulares



38

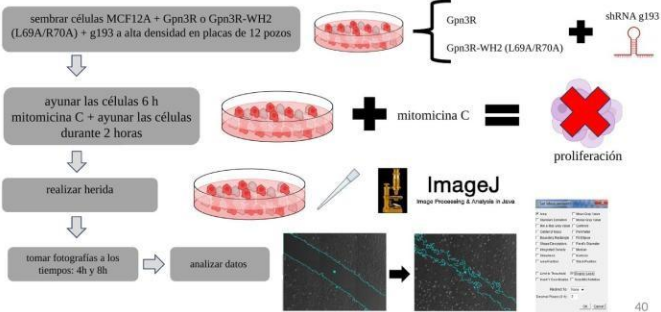
La mutante L69A/R70A muestra un patrón diferencial en la formación de lamelipodios sin alcanzar significancia estadística.



Datos expresados como media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes (n = 3). En cada experimento se cuantificó el número de lamelipodios en varios campos de observación por condición. Los datos se analizaron mediante ANOVA de tres vías con medidas repetidas, considerando como factores la línea celular, el medio de cultivo y el tiempo. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

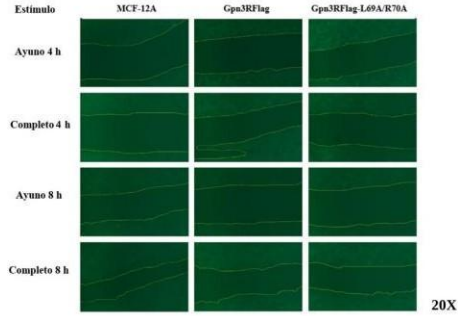
39

Objetivo 3: Determinar la importancia del posible motivo WH2 de Gpn3 en la migración de las células MCF-12A.



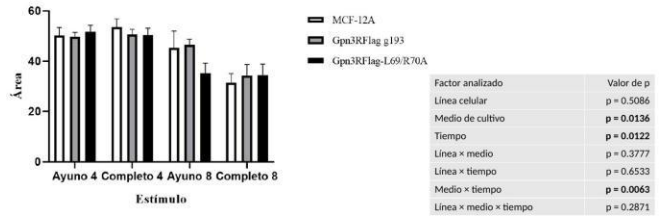
40

La migración celular es similar entre las líneas celulares



41

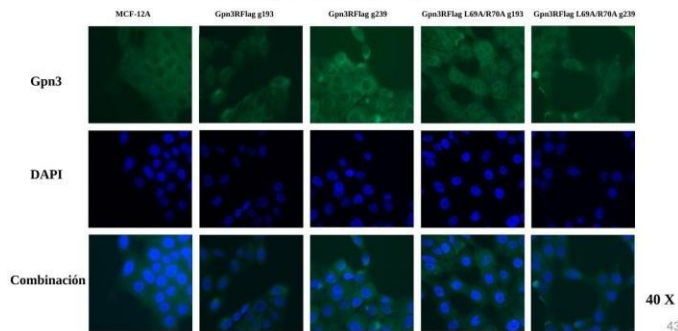
La mutante L69A/R70A en el posible motivo WH2 de Gpn3 no altera significativamente la migración en las células MCF-12A



Datos expresados como media $\pm$ EEM de 4 experimentos independientes ($n = 4$). En cada experimento se analizaron tres regiones de una misma herida —inicio, centro y final del pozo— y sus áreas se integraron para obtener un valor por condición. Los datos se analizaron mediante ANOVA de tres vías con medidas repetidas, considerando como factores la línea celular, el medio de cultivo y el tiempo. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

42

La mutante Gpn3 L69A/R70A presenta localización citoplasmática y nuclear y una morfología celular tipo empedrado

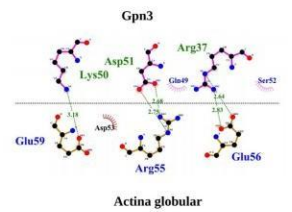


43

Discusión

Interacción del posible dominio WH2 de Gpn3 con actina globular *in silico*.

- El acoplamiento molecular sugiere que el posible dominio WH2 de Gpn3 podría interactuar con la actina globular, de manera similar a lo descrito para su funcionamiento por Pannola et al. (2002) y Domínguez (2016).
- Este clúster representa una solución energéticamente más favorable que la mayoría de las conformaciones generadas.
- La alta energía de violación de restricciones sugiere que algunas interacciones podrían estar forzadas y no reflejar totalmente la interacción fisiológica.
- Aun así, la superficie enterrada es significativa y las energías Van der Waals/electrostática negativas apoyan la plausibilidad del complejo (van Zundert et al., 2016).

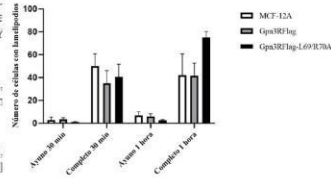


44

Discusión

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la formación de lamelipodios

- En ayuno (30 y 60 min), la línea Gpn3RFlag-L69A/R70A mostró tendencia a formar menos lamelipodios, lo que sugiere que Gpn3 podría actuar como regulador positivo de la polimerización, similar a proteínas con WH2 que activan Arp2/3, similar a proteínas WAVE o JMY (Zuchero *et al.*, 2009; Campellone, 2023).
- En cambio, en medio completo en la condición de 1 hora, la mutante mostró más lamelipodios, incluso mejor que en las células que expresan Gpn3 silvestre.
- Esto podría explicarse si Gpn3, a través del WH2, secuestra actina globular e inhibe la polimerización; al mutar el WH2, se pierde secuestro, lo que resulta en más actina disponible para polimerizar.
- No hubo diferencias significativas, pero la tendencia sugiere un papel regulador dependiente del contexto.

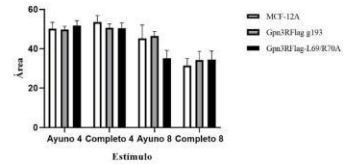


45

Discusión

Efecto de la mutación L69A/R70A en el dominio WH2 de Gpn3 en la migración

- La capacidad migratoria de las líneas celulares MCF-12A, Gpn3RFlag, y Gpn3RFlag-L69A/R70A es relativamente similar bajo las condiciones estudiadas.
- El dominio WH2 es reconocido por su interacción con la actina, sin embargo, la función de estas estructuras no se ve afectada únicamente por este dominio (Shekar, Pernier y Carlier, 2016).

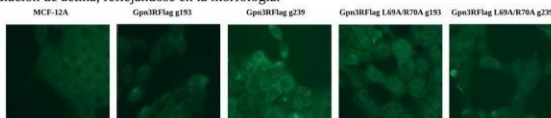


46

Discusión

La localización subcelular de Gpn3 y la morfología de las células MCF-12A cambia con la mutación L69A/R70A

- Se observó un cambio en la localización subcelular de Gpn3RFlag y en la morfología celular en la mutante. En la línea mutante, Gpn3 se localizó en el citoplasma y el núcleo, además de tener una morfología
- Estudios como en la proteína Cobl (Ahuja *et al.*, 2007) muestran que alterar dominios WH2 afecta la polimerización de actina y la forma celular.
- Gpn3 forma heterodímero con Gpn1, y ambos podrían interactuar con actina mediante dominios WH2.
- Por ello, la mutación en Gpn3 podría afectar su funcionalidad en caso de trabajar con Gpn1, alterando así la regulación de actina, reflejándose en la morfología.



47

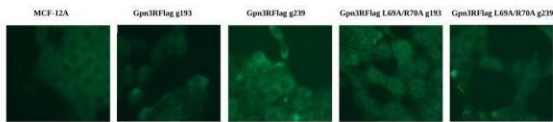
Conclusiones

- El acoplamiento molecular generó un modelo estructural compatible con una posible interacción entre el motivo WH2 de Gpn3 y la actina globular. No obstante, debido al carácter dirigido del modelado y a la presencia de violaciones de restricciones, este resultado debe considerarse una hipótesis estructural que requiere validación experimental.
- Se logró construir y validar la mutante Gpn3 L69A/R70A, así como generar líneas celulares MCF-12A con expresión estable y control de expresión endógena mediante shRNA, estableciendo un modelo confiable para estudios funcionales.
- Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, la mutación WH2 mostró una tendencia consistente de disminución de lamelipodios en el tratamiento con medio de ayuno sugiriendo un rol positivo en la nucleación/organización de actina en estrés, coherente con proteínas WH2 que activan Arp2/3.

48

Conclusiones

- Por otro lado, existió un aumento de lamelipodios en medio completo, compatible con la posibilidad de que el WH2 secuestre actina globular y module negativamente la polimerización.
- La mutación no comprometió el cierre de herida, lo que sugiere que la migración puede ser compensada por otros factores o requiere condiciones más complejas.
- La mutante mostró localización citoplasmática/nuclear y cambios morfológicos en el tratamiento de ayuno a los 30 minutos, contrario a la silvestre o el control, los cuales tuvieron una morfología típica y localización subcelular mayor en el citoplasma.



49

Prospectivas

- Evaluar compensación funcional: silenciar o inhibir otras proteínas y GTPas relacionadas a la dinámica de actina para determinar si el rol de Gpn3 en lamelipodios está enmascarado por redundancia.
- Definir función del WH2: ¿secuestra actina, promueve ensamblaje o ambas?
- Profundizar el impacto funcional y explicar el cambio de morfología/localización.
- Introducir la triple mutación en el posible motivo WIRS de Gpn3 y evaluar su participación en la formación y función de los lamelipodios.

50